Aus dem Insitut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
- Fachrichtung Fleischhygiene -
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Der Einfluß des Gefrierprozesses auf die Überlebensfähigkeit von Salmonellen in zerkleinertem Rind- und Schweinefleisch unter besonderer Berücksichtigung unterschiedlicher Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen sowie der Lagerdauer

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reinhard Riemer
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1977
Journal - Nr. 902

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
- Fachrichtung Fleischhygiene -
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Der Einfluß des Gefrierprozesses auf die Überlebensfähigkeit von Salmonellen in zerkleinertem Rind- und Schweinefleisch unter besonderer Berücksichtigung unterschiedlicher Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen sowie der Lagerdauer

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reinhard Riemer
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1977
Journal - Nr. 902

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. H. H. Frey
Referent:	Prof. Dr. G. Reuter
Korreferent:	Prof. Dr. S. Grund

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 17. Februar 1977

Meinem Vater

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549616_0061

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 1

B. Literatur 2

I. Epidemiologische Gesichtspunkte 2

1. Übertragung, Pathogenese und klinisches Bild der Enteritis - Salmonellose beim Menschen 2

2. Verbreitung der Enteritis - Salmonellose beim Menschen und vorherrschender Erregertyp 5

3. Infektionen beim Menschen durch den Genuß infizierten Fleisches sowie durch falsche Verzehrsgewohnheiten 7

4. Verbreitung von Salmonellen in Rinder- und Schweinebeständen 10

II. Cryobiologische Gesichtspunkte 13

1. Einwirkung von Gefriertemperaturen auf Mikroorganismen 13

a) Einfluß des Gefriervorganges auf unterschiedliche Arten von Mikroorganismen 13

b) Mechanismen der Gefrierschädigung von Mikroorganismen 15

c) Einfrier- und Auftauvorgang 18

d) Gefrierlagerung 20

e) Protektive Wirkung des Substrates 22

f) Destruktive Wirkung des Substrates und Einfluß des pH - Wertes 24

g) Einfluß der Zellkonzentration 26

h) Wachstumsstadium der Zellkulturen 27

i) Pathogenität und Virulenz 28

j) Subletale Schädigung von gefrierbehandelten Mikroorganismen 29

k) Aufhebung der subletalen Schädigung 31

2. Verhalten von Salmonellen in gefrorenen Substraten 33

3. Untere Wachstumsgrenztemperatur für Salmonellen 39

C. Eigene Untersuchungen 42

I. Material 42

1. Versuchsstämme 42

2. Prüfsubstrate 42

3. Material zur Überprüfung des Ausgangssubstrates 42

4. Material für die Aufbereitung der Substrate 43
5. Gefrier- und Registriereinrichtungen 43
6. Material zur Aufbereitung der Proben für den kulturellen Nachweis 44
7. Prüfmedien zur Identifizierung und Kultivierung 45
II. Methodik 45
1. Überprüfung des Status der Versuchssubstrate 45
2. Überprüfung der Teststämme 46
3. Aufbereitung der Prüfsubstrate für den Einmischvorgang 46
4. Beimpfung der Substrate 49
5. Einfrieren und Temperaturregistrierung 50
6. Aufbereitung der Proben für den kulturellen Nachweis 52
7. Kultureller Nachweis und Identifizierung 54
III. Ergebnisse 56
1. Beschaffenheit des Substrates Fleisch 56
2. Beschaffenheit der Versuchsstämme 58
3. Messungen des Einfriervorganges 58
4. Gefrierversuche mit flüssigen und festen Substraten 60
D. Besprechung der Ergebnisse 89
E. Schlußfolgerungen 108
F. Zusammenfassung 110
Summary 112
G. Literaturverzeichnis 116

A. Einleitung

Obwohl große Fortschritte in der allgemeinen Hygiene und der Bekämpfung der Infektionskrankheiten erzielt wurden, nimmt die Anzahl von Enteritis-Salmonellosen ständig zu. Die Ökologie der Erreger dieser Zoonose erschwert es außerordentlich, die Infektkette zum Menschen zu unterbrechen. In großem Maße sind infiziertes Fleisch und Fleischwaren Ursache der Erkrankung. Es ist daher eine wichtige Aufgabe der Fleischhygiene, alle möglichen Verfahren zu erproben, die das Risiko einer Gesundheitsschädigung des Menschen herabsetzen können.

Die keimreduzierende Wirkung des Gefrierprozesses auf verschiedene Mikroorganismen ist bekannt. Es liegen jedoch nur sehr wenige quantitative Angaben über die Einwirkung von Gefriertemperaturen auf das Überleben von pathogenen Enterobacteriaceae und damit auch von Salmonellen im Fleisch schlachtbarer Haustiere vor.

Ziel dieser Untersuchungen war es daher, zu prüfen

a) welche Einflüsse unterschiedliche Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen, Lagerdauer sowie unterschiedliche Substrate auf die Überlebensfähigkeit von Salmonellen haben

und b) ob durch den Gefrierprozeß Keimabnahmen zu erzielen sind, die das Infektionsrisiko des Menschen herabsetzen.

B. Literaturübersicht

I. Epidemiologie

1. Übertragung, Pathogenese und klinisches Bild der Enteritis - Salmonellose beim Menschen

Die Salmonellose ist eine durch die Bakterien der Salmonellagruppe hervorgerufene Krankheit. Unter Salmonellen versteht man gram - negative, aerobe, nicht sporenbildende Stäbchen, die auf einfachen Nährböden wachsen. Sie sind in der Regel peritrich begeißelt, und sind biochemisch verhältnismäßig einfach zu definieren (ROLLE u. MAYR, 1966). Das Genus Salmonella gehört zur Familie der Enterobacteriaceae, also zu der Gruppe von Bakterien, die vorwiegend im Verdauungstrakt gesunder oder kranker Menschen und Tiere angetroffen wird (TITZE, 1970). Die Salmonellose ist weiterhin eine Zoonose. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Zoonosen als Krankheiten und Infektionen, die natürlicherweise zwischen Wirbeltieren und Menschen übertragen werden (SCHOOP, 1972). ZETKIN u. SCHALDACH (1964) verstehen unter einer Zoonose jede auf den Menschen übertragbare Tierkrankheit, die als eigentliche Erkrankung beim Tier auftritt und durch Tiere oder tierische Erzeugnisse auf den Menschen übertragen wird.

Bei allen Salmonellosen erfolgt die Infektion über den Verdauungstrakt. Während 'Typhus'- und 'Paratyphus'-Bakterien stark an den Wirtsorganismus Mensch adaptiert sind und deshalb meist direkt oder indirekt vom Menschen herkommen, ist dieses bei den Salmonellen der sog. Enteritisgruppe nicht die Regel (BULLING, 1968). Nach DRÄGER (1971) ist der Symptomkomplex der menschlichen Enteritis-Salmonellosen als Resultat einer Massenzerstörung von lebenden Keimen im Organismus und des hierdurch zustandekommenden Freiwerdens von Endotoxinen anzusehen. Ob die Zellen außerhalb des menschlichen Körpers präfor-

miert sein können oder ob sie sich erst im Darm vermehren müssen, ist noch nicht eindeutig geklärt.

RALOVICH (1968) vertrat die Ansicht, daß auch Nahrungsmittelvergiftungen hervorrufende Salmonellen typische Infektionskrankheiten verursachen. Der erste Schritt einer derartigen Infektion ist das Penetrieren des Darmepithels. Im Organismus gelangen die Salmonellen in einem bisher nicht genau ermittelten Teil begrenzt zur Vermehrung. Zu einer Generalisation kommt es gewöhnlich nicht, da die Virulenz der Erreger nicht hoch genug ist, um die RES - Blockade durchbrechen zu können.

Falls der Mensch mit Salmonellen kontaminierte Lebensmittel zu sich nimmt, können nach 6 - 12 Stunden Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Fieber auftreten. Weiterhin kann es zu einer Entzündung der Magen- und Dünndarmschleimhaut kommen (BULLING, 1968). Im Gegensatz zu den 'Typhus'- und 'Paratyphus'-Keimen haben die Enteritis-Salmonellen keine besondere Affinität zum Gallensystem, weshalb die Ausscheider dieser Erreger selten zu 'Dauer'-Ausscheidern werden. In vielen Fällen ist der Befund einmalig und nicht reproduzierbar. In anderen Fällen werden die Salmonellen mit oder ohne medikamentöse Behandlung im Verlauf von wenigen Wochen aus dem Darm eliminiert (LANG, 1975).

KNOTHE u. WIEDEMANN (1970) waren ebenfalls der Meinung, daß bei vielen Personen nur kurze Zeit nach der Infektion ein positiver Keimbefund gegeben ist. Die Ausscheidungsdauer verläuft in Form einer hyperbelähnlichen Kurve. Die Autoren betrachteten einen Infektionsverlauf bis maximal 20 Wochen nicht als echte Haftung des Mikroorganismus im Makroorganismus und vermuteten, in Übereinstimmung mit DUBOS u. SCHADLER (1960) sowie BOHNHOFF u. MILLER (1962), einen in seiner Wirkung bisher ungeklärten Implantationsantagonismus der Darmflora gegenüber Salmonellen. Dieser Antagonismus kann durch hohe Gaben von

Streptomycin und dadurch bedingte Ausschaltung der natürlichen Darmflora weitgehend beseitigt werden. Ist jedoch die Widerstandskraft des Makroorganismus noch gering ausgeprägt (Kleinkinder) oder herabgesetzt (kranke oder alte Menschen), kann es in einer weiteren Phase der Salmonellose zu einem Eindringen der Erreger in den Kreislauf mit extraintestinalen Krankheitsbildern wie z.B. Pleuritiden, Kniegelenksempyemen, Osteomyelitiden und Meningitiden kommen (OPRÉE, 1976). In der Regel verläuft eine derartige Allgemeininfektion mit den Anzeichen einer paratyphösen Erkrankung (DIMMLING, 1970). Todesfälle bei erwachsenen Menschen sind selten (DRÄGER, 1971). Da bei der Enteritis-Salmonellose sowohl die Merkmale einer Intoxikation als auch die einer Infektion gegeben sein können, spricht man daher heute von einer Toxiinfektion (DRÄGER, 1971).

Nach SCHEIBNER (1968) muß auch mit einer Beteiligung von Histamin am Krankheitsgeschehen gerechnet werden. Histamin, welches durch die in den Salmonellen enthaltene Histidin-Decarboxylase aus dem in Lebensmitteln enthaltenen Histidin gebildet werden kann, rief bei einer artifiziellen Anwendung am Darmtrakt für eine Salmonellose typische Symptome hervor. Die Fähigkeit zur Histaminbildung konnte der Autor bei ca. 50 % von 105 untersuchten Salmonellastämmen feststellen. Inwieweit diese biochemische Fähigkeit der Salmonellen allerdings ein Pathogenitätsmerkmal ist, konnte aus den Untersuchungen noch nicht geschlossen werden.

Von Wichtigkeit für die Entstehung einer Enteritis-Salmonellose ist auch die Zahl der aufgenommenen Keime. McCULLOUGH u. EISELE (1951) und WILSON u. MILES (1957) untersuchten diesen Themenkomplex. Eine einheitliche Aussage konnte nicht gemacht werden. Bei Untersuchungen, in deren Verlauf sich die Autoren selbst sowie weitere Freiwillige mit verschieden hohen Dosen von Salmonellen unterschiedlicher Serotypen infizierten, konnten allgemein gültige Mindestzahlen für einen Krankheitsausbruch nicht bestimmt wer-

den. Nach BRODHAGE (1969), BADER (1972) und NOSKOWA (1976) ist für eine Erkrankung an Enteritis-Salmonellose die Aufnahme lebender Erreger in der Größenordnung von mehreren hunderttausend bis Millionen Keimen pro Gramm oder Milliliter Lebensmittel erforderlich. D'AOUST u. PIVNICK (1976) berichteten jedoch über Fälle in den USA und Kanada, bei denen bereits 100 - 250 Keime/g in Schokolade einen Ausbruch der Krankheit bei mehr als 200 Personen bewirkten.

Die aus klinischer Sicht oft gestellte Frage, welche Species für den Menschen pathogen sind, läßt sich nicht sicher beantworten, da sich nur wenige Arbeiten auf eine Aufgliederung in die bei Patienten einerseits und bei Keimträgern andererseits isolierten Kulturen beziehen (TITZE, 1970). Ob man gegenüber einer Enteritis-Salmonellose eine Immunität erwerben kann, ist ebenfalls umstritten. WINKLE u. ROHDE (1969) stellten die Ausbildung einer Immunität wegen der kurzen Dauer der Gastroenteritis in Frage. HÄRING (1962) lehnte eine Immunität gänzlich ab. Er vertrat die Meinung, daß sich der Mensch beliebig oft infizieren könne. Dagegen wies RAETTIG (1965) bei Mäusen sowie LEMKE (1968) bei Kälbern mittels oraler Immunisierungen mit abgetöteten *S. typhimurium* -Stämmen eine eindeutige Immunität nach.

2. Verbreitung der Enteritis-Salmonellose beim Menschen und vorherrschender Erregertyp

Nach BRODHAGE (1969) waren die Salmonellen die häufigste Ursache für menschliche Nahrungsmittelvergiftungen. Die Enteritis-Salmonellen nahmen in letzter Zeit erheblich an Bedeutung zu und hatten nach MAYR (1973) noch niemals die Gewichtigkeit wie heute. Einen Überblick über die Art der Erreger gab PÖHN (1975). Danach wurden im Jahr 1974 in der Bundesrepublik Deutschland einschl. West-Berlin

29.862 Salmonellastämme erstisoliert, die 203 verschiedenen Salmonella-Arten zugeordnet werden konnten. Als Untersuchungsmaterial wurde zu 99 % Stuhl und Urin angegeben. Die Meldeziffern der nach § 3 des Bundesseuchengesetzes meldepflichtigen Enteritis-infektiosa-Erkrankungen sind in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. 1973 wurden 15.952 Erkrankungen mit 56 Todesfällen gemeldet (PÖHN, 1975). Für das Jahr 1974 registrierte WEISE (1976) 22.243 Erkrankungen mit 73 Sterbefällen. SEELIGER (1970) äußerte die Meinung, daß nur ca. ein Fünftel der tatsächlich beim Menschen auftretenden Salmonellosen bekannt werden. BULLING (1968) vertrat die Ansicht, daß ca. o.1 % der Bevölkerung zeitweise oder dauernd Ausscheider von Salmonellabakterien einschließlich S. typhi und S. paratyphi A und B sind. ANDERS (1971) berichtete, daß 75 % aller Erkrankungsfälle als Einzelfälle oder als Kleinraumepidemien auftreten, wobei weniger als 10 Personen erkrankten. PÖHN (1975) setzte diese Zahl sogar mit 92.5 % der bekannten Fälle an.

EDEL u. KAMPELMACHER (1972) stellten die Kontamination der Umwelt als Ausgangspunkt des Salmonellose-Kreislaufes dar, der über die Nutztiere und deren Produkte zum Menschen führt. PIETZSCH (1970) erklärte den von 1965 bis 1968 erfolgten Anstieg der Salmonellenfunde in tierischen Lebensmitteln mit der Kontamination des Fleisches durch menschliche Ausscheider. Er räumte jedoch ein, daß sich nicht feststellen ließ, inwieweit die Ausscheider durch den Genuß von Fleisch intravital erkrankter Tiere infiziert wurden. Dagegen sahen HABS (1971) und MÜHLENBERG et al. (1973) den mit Salmonellen infizierten Menschen als Endglied einer Infektkette an, die ihren Ausgang fast immer von einem latent infizierten Schlachttier genommen hat. Die Gefahr der Infektion des Menschen durch Schlachttiere und deren Produkte erschien ihnen daher wesentlich gefährlicher als die Kontamination von Lebensmitteln durch Personen, die mit der Lebensmittelgewinnung und -bearbeitung befaßt sind. LANG (1975) wies in diesem Zusammenhang auf

die unbefriedigenden Ergebnisse hin, die bei der nach den §§ 17 und 18 des Bundesseuchengesetzes vorgeschriebenen bakteriologischen Kontrolluntersuchung der Beschäftigten des Lebensmittelgewerbes anfallen. Bei einem aus wirtschaftlichen Erwägungen gewählten Untersuchungsabstand von einem Jahr werden rechnerisch weniger als 10 % und bei zweijährigem Untersuchungsabstand weniger als 5 % der zwischen den Untersuchungen vorhandenen Ausscheider erfaßt. Trotz Kenntnis des Salmonellen-Kreislaufes bleibt die Ermittlung der Infektionsquellen äußerst unbefriedigend. 1974 konnten sie nur für 2.6 % der Erkrankungsfälle geklärt werden (PÖHN, 1975).

Die epidemiologisch größte Bedeutung unter den Enteritis-Salmonellen scheint S. typhimurium zu haben (GIBSON, 1961; PIETKIEWICZ u. BUCZOWSKI, 1969; MÜHLENBERG, 1970; TITZE, 1970; HUGHES, 1971; TACKE et al., 1973; MORSE u. DUNCAN, 1974; PÖHN, 1975a, b; GUINÉE, 1975; BRODHAGE, 1975). Es können durch besondere Umstände zeitweise auch andere Salmonella-Species im Vordergrund stehen. FOX (1974) berichtete aus den USA, daß 1973 bei 26.000 Fällen S. agona , durch peruanisches Fischmehl eingeschleppt, im Vordergrund stand.

3. Infektionen beim Menschen durch den Genuß infizierten Fleisches sowie falscher Verzehrsgewohnheiten

Zahlreiche Autoren berichteten über Salmonellose-Ausbrüche beim Menschen, die nachweisbar durch das Fleisch intravital infizierter Schlachttiere hervorgerufen wurden. DRÄGER (1971) teilte mit, daß von 1922 - 1944 nach Not- und Krankschlachtungen 232 Fleischvergiftungsepidemien auftraten, bei denen 11.441 Personen erkrankten und 78 den Tod fanden. Erkrankungen nach dem Genuß von Fleisch krank- oder notgeschlachteter Tiere schienen bevorzugt in Kriegs- oder Notzeiten aufzutreten. So berichtete VARENNE (1954)

von einer Massenerkrankung von 320 Personen nach dem Verzehr des Fleisches eines mit S. typhimurium verseuchten kolikkranken Pferdes. 1942 trat in Quenoy-sur-Deule (Frankreich) eine Salmonella-Epidemie mit 1300 Erkrankungen und 2 Todesfällen auf. Ursache war das Fleisch einer Kuh mit akuter hämorrhagischer Entzündung des Intestinaltraktes, bei der die bakteriologische Untersuchung unterlassen wurde (LABIE, 1967). 1948 erkrankten 56 Personen in 21 Familien nach dem Genuß von rohem Pferdemett an akutem fieberhaften Brechdurchfall. Bei der Schlachttier- und Fleischuntersuchung des Pferdes, dessen Fleisch zu der Epidemie geführt hatte, konnte kein entsprechender Befund erhoben werden. Bei der bakteriologischen Untersuchung wurde aus der Muskulatur S. typhimurium isoliert (GLASSER u. H. REUTER, 1948). In einer Übersicht der Erkrankungen durch Lebensmittel in der Nachkriegszeit (1946 - 1948) im Lande Nordrhein-Westfalen verwiesen TRÜB u. REPLOH (1954) auf vier Massenerkrankungen durch Salmonella-verseuchte Wurstwaren und auf einen Ausbruch, bei dem sich 72 Personen nach dem Genuß des Fleisches einer notgeschlachteten Kuh mit Salmonellen infizierten. Über weitere ausgedehnte Massenvergiftungen mit S. typhimurium und S. newport , deren Ursachen intravital infiziertes Fleisch und unterlassene bakteriologische Untersuchungen waren, berichteten CASELITZ (1950), HORNUNG (1950) und HEUER (1954). In neuerer Zeit teilten MÜHLENBERG et al. (1973) mit, daß 46 Angestellte einer Großschlächterei im nördlichen Niedersachsen bis zur Aufdeckung der Epidemie 2 - 4 Wochen S. manchester ausschieden. Ursache war ein Rind, in dessen Fleisch der Erreger nachgewiesen werden konnte.

Auch latente Salmonellosen bei Schlachttieren stellen eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Nach KLEIN (1959) bietet der Tatbestand einer Normalschlachtung bzw. das Vorliegen einer Krankheit, die in keinem Zusammenhang mit der Salmonellose steht, keine Garantie dafür, daß nicht eine solche vorliegt. KOTTER u.

GEDEK (1971) beurteilten die Gesundheitsgefährdung des Menschen als gering, wenn die Salmonellen in den Mesenteriallymphknoten latent infizierter Schweine enthalten waren, da die Erreger beim Ausschmelzen des Gekrösefettes abgetötet werden. Eine erhöhte Infektionsgefahr erblickten sie jedoch im Genuß roher Leber, die oft das Erregerreservoir latent infizierter Tiere darstellt. Es sind aber viele Fälle bekanntgeworden, bei denen durch den Genuß des Fleisches latent infizierter Tiere Massenerkrankungen hervorgerufen wurden. PACHL (1963) berichtete über eine solche Epidemie, bei der 1962 in Leipzig 400 Menschen erkrankten und 9 Todesfälle auftraten. Durch PRIMAVESI (1956) wurde eine Krankenhausendemie bekannt, in deren Verlauf 69 Personen an einer durch S. heidelberg hervorgerufenen akuten Gastroenteritis erkrankten. Die Endemie wurde durch Mettwurst hervorgerufen, die nachweisbar aus dem Fleisch eines normal geschlachteten, latent infizierten Schweines hergestellt worden war. Drei Hamburger Familien infizierten sich nach dem Verzehr des Fleisches einer latent mit S. dublin infizierten Kuh, die sich im Stadium der 'autogenen Reinfektion' befunden hatte. Dieses wurde durch den Fleischbeschautierarzt nicht erkannt (RASCH, 1957).

Auf dem Sektor der Fleischernährung liegt die Gefahr heute nicht bei einer bestimmten 'unreinen' Fleischart, sondern bei einer zur Kontamination disponierten Aufbereitungsart des Fleisches, z.B. der künstlich vergrößerten Oberfläche des Hackfleisches sowie der Gewohnheit, rohe oder halbrohe Steaks zu essen (DIMMLING, 1970). Auch nach KAMPELMACHER (1971) ist vor allem Hackfleisch als Ursache menschlicher Salmonellosen anzusehen. Bei einer Krankenhausendemie mit 319 Erkrankungen war eine fehlerhaft lange Lagerung des Hackfleisches mit starkem Anreicherungseffekt für Salmonellen die Ursache (BISCHOFF, 1956). Eine S. panama - Infektion, in deren Verlauf bei 23 von 74 betroffenen Personen der Erreger nachgewiesen wurde, war durch ungenügend gekühltes Tartarfleisch hervorgerufen worden (ERNST u. GURDAN, 1973). Aber auch vorschriftsmäßig im Kühlschrank aufbewahrtes Fleisch führte

zu einer durch S. enteritidis hervorgerufenen Gastroenteritis bei zwei Personen und einem Hund (WINKLE u. ROHDE, 1964; ALTERAUGE, 1971). Gefahr geht auch von der neuzeitlichen Verzehrsgewohnheit aus, Schnellmahlzeiten in Imbißstuben zu sich zu nehmen. KUSCHFELDT (1972) konnte nach einer Salmonelleninfektion sowohl in rohen als auch in gebratenen Frikadellen Salmonellen nachweisen. Dies spricht dafür, daß es bei einem durch Stoßgeschäft bedingten schnellen Verkauf der Ware nicht immer zu einer für die Abtötung der Keime erforderlichen Brattemperatur kommt.

4. Verbreitung von Salmonellen in Rinder- und Schweinebeständen

Da sowohl intravital massiv infizierte sowie unter bestimmten Bedingungen auch latent infizierte Tiere zum Ausgangspunkt menschlicher Salmonellosen werden können (ZIPPLIES, 1964), ist es von Interesse, zu erfahren, in welchem Umfang Rinder- und Schweinebestände in Mitteleuropa mit Salmonellen verseucht sind und welche Species im Vordergrund stehen. In Tabelle 1 sind der besseren Übersicht wegen Untersuchungsergebnisse aus 5 europäischen Ländern zusammengestellt. In der Bundesrepublik Deutschland wurden nach Angaben von BULLING u. PIETZSCH (1968) im Untersuchungszeitraum 1961 - 1965 bei Rindern S. dublin und S. typhimurium mit 85 % der insgesamt bei Tieren isolierten Typen am häufigsten angetroffen. Dies wurde anschließend auch von PIETZSCH (1970) bestätigt. Seit 1971 aber wurde ein absoluter und relativer Rückgang der S. dublin-Infektionen bei Rindern, Kälbern und Schweinen zugunsten von S. typhimurium und anderen Arten festgestellt (PIETZSCH u. BULLING, 1973). PIENING u. WERMERSSEN (1972) teilten mit, daß trotz Ausmerzung von 1426 Dauerausscheidern aus insgesamt 261 Rinderbeständen im Zeitraum von 34 Jahren eine Abnahme der S. dublin-Infektionen in Schleswig-Holstein nicht zu beobachten war. S. typhimurium trat mehr örtlich begrenzt auf, rief

Tabelle 1

Verseuchungsgrad und vorherrschende Salmonella-Serotypen in Rinder- und Schweinebeständen einiger europäischer Länder

Land	Autor und Jahr der Veröffentlichung		Zeitraum	Tierart	Gesamtzahl Tiere	Gesamtzahl Proben	insgesamt % positiv	vorherrschende Serotypen
BRD	Schütz, G.	58	–	Schwein	520		5,0	–
	Götze, U.	68	67	Kalb	451		0,67	typhimurium
	Hadlok, R.	66	63/65	Schwein	2 837		1,23	–
	Verschiedene (nach Götze, U.)	72	50/71	Schwein	11 000		1 - 2	diverse
	Piening, C. und Wermerssen, H.	72	62/70	Rind	52 000		2,7	typhimurium, dublin
	Häring, W.	72	70	Schwein	1 100		2,09	–
	Habermalz, D.	73	72/73	Rind	600		1,83	dublin, typhimurium
	Stolle, A.	74	73/74	Schwein	993		1,6	diverse
DDR	Stellmacher, W.	63	–	Rind	500		5,4	dublin
	Held, R. und Peter, O.	65	–	Schwein	8 930		8,5	choleraesuis
	Jungnitz, M. und Linsert, H.	69	63/69	Rind	1 899		19,6	dublin, typhimurium
	Lütcke, J. et al.	71	61/70	Rind, Kalb, Schwein		254 948	1,1	dublin, choleraesuis
	Schulz, W. et al.	75	65/73	Rind, Kalb	–	–	11,7	dublin
NL	Kampelmacher, E. et al.	61	–	Schwein	2 100		25,3	diverse
	Kampelmacher, E. et al.	62	–	Schwein	1 000		11,0	diverse
	Kampelmacher, E. et al.	63	–	Schwein	1 566		31,7	typhimurium
	Guinée, P. A. M. et al.	64	61/63	Rind	600		0,33	typhimurium
	Guinée, P. A. M. et al.	65	–	Schwein		1 355	16,6	diverse
	Götze, U. und Retzlaff, N.	66	65	Schwein		110	42,7	panama, typhimurium
	Edel, W. und Kampelmacher, E.	71	68/69	Kalb		6 837	0,7	typhimurium, dublin
GB	Rankin, J. D. et al.	69	65/69	Kalb	5 693		1,1	dublin
	Hughes, L. E. et al.	71	58/69	Rind	15 828		–	dublin, typhimurium
	Richardson, A. und Watson, W. A.	71	69	Kalb	500		22,3	dublin
	Ghosh, A. C.	72	–	Schwein	1 053		32,0	diverse
	Skovgard, N. und Brest-Nielsen, B.	72	–	Schwein	–	–	7,0	diverse
	Richardson, A. und Fawcett, A. R.	73	–	Kalb	183		20,8	dublin
F	Renault, L. et al.	74	61/71	Rind, Schwein	–	–	Rind 2,0 Schwein 1,3	typhimurium, enteritidis typhimurium

dafür aber erheblichere Verluste hervor. Die Schweinebestände scheinen nach übereinstimmenden Berichten zu ca. 1 - 2 % latent mit Salmonellen verseucht zu sein (HADLOK, 1966; HARING, 1972; STOLLE, 1974), wobei die latent infizierten Tiere nicht immer erfaßt werden konnten (STOLLE, 1974).

BULLING (1968) hob hervor, daß die Salmonellenverseuchung der Haustiere der Bundesrepublik vom Norden nach Süden abnahm. Die jährliche Isolierungsrate aus ca. 250.ooo Bakteriologischen Untersuchungen im Rahmen der Amtlichen Fleischuntersuchung lag zwischen o.2 % in Süd- und 3 % in Norddeutschland (BULLING, 1976).

Ebenso wie in der Bundesrepublik Deutschland nahmen auch in der Deutschen Demokratischen Republik Infektionen mit S. dublin bei Rindern den ersten Rang ein (STELLMACHER, 1963; BEER, 1967; JUNGNITZ u. LINSERT, 1969). SCHULZ et al. (1975) stellten seit 1971 eine rückläufige Tendenz durch verbesserte Haltungs- und Fütterungshygiene fest. In Schweinebeständen der DDR steht S. choleraesuis, gefolgt von S. typhimurium, an der Spitze des Krankheitsgeschehens (BEER, 1967; LÜTCHE et al., 1971). Durch SCHMIDT u. WITTMANN (1968) wurde bekannt, daß mit der Häufung der S. choleraesuis - Infektionen in den Schweinebeständen auch beim Menschen verstärkt Erkrankungen mit diesem Serotyp auftraten. S. choleraesuis ist nach dem Bericht von SCHÖLL et al. (1973) stärker an das Schwein adaptiert als andere Salmonellen. WOHLFAHRT (1971) berichtete, daß der Erreger bei den im Bezirk Halle durchgeführten Schweinesektionen mit 94 % der isolierten Salmonellen an der Spitze der Befunde stand.

In den Niederlanden befand sich unter den Salmonellen S. dublin mit ca. 90 % und S. typhimurium mit ca. 10 % als Erreger der Rindersalmonellose im Vordergrund. Dabei war S. dublin zu 10 % an den Gesamtverlusten bei Rindern beteiligt (GUINÉE et al., 1964; BAARS, 1968; GUINÉE u. VALKENBURG, 1975).

In Großbritannien herrschte als Erreger der Rindersalmonellose bis 1973 eindeutig S. dublin vor (GIBSON, 1961; BUXTON, 1961; SOJKA u. FIELD, 1970; HUGHES et al., 1971; RICHARDSON u. FAWCETT, 1973). Auch in diesem Land sind in neuerer Zeit S. typhimurium und andere Serotypen - bei einem gleichzeitigen Rückgang von S. dublin - in Rinderbeständen im Zunehmen begriffen (RICHARDSON, 1975). Als Erreger der Schweinesalmonellose dominierte in England S. choleraesuis (BUXTON, 1961; O'BRIAN, 1966; SOJKA u. FIELD, 1970).

Insgesamt zeigt sich, daß die Salmonellose in den Tierbeständen hinsichtlich des Erregerspektrums international viele Parallelen aufwies. Die Ausbreitung der Salmonellose mit nur einem Serotyp war weder national begrenzt noch bestand eine eindeutige Wirtsspezifität (BUXTON, 1961).

II. Cryobiologische Gesichtspunkte

1. Einwirkungen von Gefriertemperaturen auf Mikroorganismen

a) Einfluß des Gefriervorganges auf unterschiedliche Arten von Mikroorganismen

Jedes Gefrieren und Auftauen bewirkt die Abtötung eines bestimmten Anteiles der in einem zu gefrierenden Substrat anfänglich vorhandenen Mikroorganismen (BORGSTRÖM, 1955; RUPP, 1968; SCHMIDT-LORENZ, 1974). Die Überlebensraten können zwischen 1 und 100 %, normalerweise jedoch zwischen 10 und 50 % liegen (SCHMIDT-LORENZ, 1963; ELLIOT u. STRAKA, 1964; KITCHELL u. INGRAM, 1956; RUPP, 1968; HERRMANN, 1970; ROBERTS, 1974; SCHMIDT-LORENZ, 1974).

Während Sporen und Toxine von Mikroorganismen praktisch unempfindlich gegenüber dem Gefriervorgang waren und sich auch die Toxizität nicht veränderte (INGRAM, 1951; HERRMANN, 1970; SCHMIDT-LORENZ, 1974; ROBERTS, 1974), zeigten vegetative Zellen von Hefen und Pilzen je nach Art und

physiologischem Zustand sehr unterschiedliche Resistenz (BORGSTRÖM, 1961; SCHMIDT-LORENZ, 1970, 1974). Enteroviren und Bakteriophagen können gleichfalls sehr kälteresistent sein (LYNT, 1966; DIGIROLAMO et al., 1970). Grampositive Bakterien waren ebenfalls relativ resistent gegenüber dem Gefrierprozeß und noch widerstandsfähiger gegenüber langdauernder Gefrierlagerung (LARKIN et al., 1955; BORGSTRÖM, 1961; BATE-SMITH, 1967; SCHMIDT-LORENZ, 1974). Dabei erwiesen sich Mikro- und Enterokokken als ganz besonders gefrierresistent (ELLIOT u. MICHENER, 1961; SPLITSTOESSER u. WETTERGREEN, 1964). BORNEFF u. KIETZMANN (1975) konnten bei der Überprüfung der Überlebensfähigkeit von S t a p h . a u r e u s in Speiseeis allerdings nur in der ersten Phase des Gefrierprozesses eine gegenüber anderen Keimen erhöhte Kälteresistenz nachweisen.

Gram-negative Bakterien erwiesen sich als weniger resistent gegen den Gefriervorgang und wurden auch von längerer Lagerdauer stärker beeinflußt (BORGSTRÖM, 1961; SCHMIDT-LORENZ, 1974). SCHMIDT-LORENZ u. GUTSCHMIDT (1968) sowie SCHMIDT-LORENZ (1974) wiesen darauf hin, daß die hohe Empfindlichkeit der gram-negativen Keime auf einer Denaturierung der mit dem Murein kovalent verbundenen Lipoproteine der Zellwand beruhen könnte.

Abgesehen von den Mikroorganismen, die sich durch den Gefrierprozeß in ihrer Lebensfähigkeit beeinflussen lassen, gibt es auch solche, die bei Gefriertemperaturen noch in der Lage sind, sich zu vermehren.

Kältetolerante Bakterien konnten sich noch bei - 5 °C bis - 10 °C vermehren, Hefen bei - 10 °C bis - 12 °C und Pilze sogar bei - 18 °C (HAINES, 1931; INGRAM, 1951; MICHENER et al., 1960; MICHENER u. ELLIOTT, 1964; ARPAI, 1965; LARKIN u. STOKES, 1966; 1968; SCHMIDT-LORENZ, 1974). Die Vorbedingung für jede Vermehrung im Gefrierbereich ist, daß die Zellen selbst nicht gefrieren und ausreichend freies Wasser im Substrat vorhanden ist. Weiterhin schei-

nen auch Enzyme und enzymbildende Systeme, die bei niedrigen Temperaturen wirksam werden sowie eine besondere molekulare Struktur der Lipide der Biomembranen erforderlich zu sein (SCHMIDT-LORENZ, 1972). Genetisch gesehen ist bei den kältetoleranten Mikroorganismen die Bildung kältestabiler und wärmeempfindlicher, bei den mesophilen Keimarten die Bildung kältelabiler und thermostabilerer Proteine determiniert. Dabei ist die Frage noch offen, ob die Steuerung dieser Prozesse durch einige wenige lokalisierte oder durch weit verteilte Multi-Genkomplexe verläuft. Während bei den mesophilen Mikroorganismen bereits mehrere Defektmutanten, bei denen der obere oder untere Temperaturbereich der Vermehrung eingeschränkt war, bekannt wurden (SCHMIDT-LORENZ, 1972), ist über erfolgreich induzierte Mutanten von mesophil nach psychrophil mit eindeutiger Verschiebung des gesamten Temperaturbereiches in Richtung tieferer Temperaturen nur selten berichtet worden (EDDY u. KITCHELL, 1959; AZUMA et al., 1962; OLSEN u. METCALF, 1968). Nach bisherigen Erfahrungen sind natürliche Populationen hinsichtlich ihres Vermehrungsminimums in der Regel außerordentlich stabil (SCHMIDT-LORENZ, 1972).

b) Mechanismen der Gefrierschädigung von Mikroorganismen

Es ist noch nicht völlig geklärt, welche Faktoren beim Gefrierprozeß schädigende oder abtötende Effekte auf Mikroorganismen ausüben. Seit den von WEISER u. OSTERUD (1945) durchgeführten Gefrierversuchen mit 15 - 20 Stunden alten E. c o l i - Kulturen unterschied man zwischen einem initialen Gefriertod von Mikroorganismen, dessen Parameter nur der Einfriervorgang und das Auftauen sind, und dem Lagertod, der eine direkte Funktion von Lagerzeit und Lagertemperatur darstellt (MATTICK, 1951; RUPP, 1968). BORGSTRÖM (1961) und ROBERTS (1974) unterteilten den Gefriertod von Mikroorganismen noch weiter in Kühltod, Gefriertod, Gefrierlagertod, Auftautod und Nachauftautod.

Entsprechend ihrer Auffassung ist diese Aufteilung notwendig, um dem im jeweiligen Stadium unterschiedlichen Mechanismus, der zur Abtötung der Keime führt, Rechnung zu tragen. WEISER u. OSTERUD (1945) nahmen an, daß das Ausmaß des initialen Gefriertodes nur unerheblich von der Gefriertemperatur und -geschwindigkeit abhängig sei, da die Keimabtötung nur in der kurzen Phase des Einfrierprozesses erfolgte, in der sich die Bildung des extrazellulären Eises vollzog. Eine weitere Möglichkeit der Schädigung könnte der mechanische Insult durch intrazelluläre Eisbildung darstellen. Eine derartige Zellschädigung setzt jedoch sehr hohe Einfriergeschwindigkeiten voraus, die sich im Bereich von mehreren hundert bis zu tausend Grad Celsius pro Minute bewegen müßten. Dabei soll die Zellschädigung einerseits von dem Ausmaß abhängen, in dem das intrazelluläre Wasser die Zellmembran nach außen passieren kann, andererseits von der Größe der intrazellulären Eiskristalle und ihrem Verhältnis zur Zellgröße (NICKERSON u. SINSHEY, 1972; FENNEMA, 1973). MAZUR (1966) vertrat jedoch die Meinung, daß besonders bei Bakterien die Abkühlraten für eine Zellschädigung durch intrazelluläre Kristallbildung noch wesentlich größer sein müßten, da selbst die bei einer Gefriergeschwindigkeit von 100 °C / Minute gebildeten kristalle aufgrund ihrer Größe und Ausbildung relativ wenig Schädigungen hervorrufen könnten. Auch WOODBURN u. STRONG (1960) stellten fest, daß bei der mechanischen Schädigung von Bakterien die intrazelluläre Eiskristallbildung nur von untergeordneter Bedeutung war.

Es besteht die Möglichkeit, daß in einzelnen biologischen Substraten mit einem geringen Anteil extrazellulären Wassers die Kristallisation intrazellulär beginnt. Die vorherrschende Auffassung ist jedoch, daß die Kristallisation, unabhängig von der Einfrierrate, extrazellulär beginnt (MAZUR, 1966). Davon ausgehend kann die weitere Kristallbildung ausschließlich extrazellulär oder aber auch intrazellulär erfolgen. Dies geschieht entweder durch intrazelluläre Kristallisation selbst oder, bei

Durchbrechen der Zellmembran, durch extrazelluläres Eis (FENNEMA, 1973). Der Autor gab weiterhin an, daß es bei sehr langsamem Gefrieren zu einer Wasserdampfdruckdifferenz zwischen den extrazellulär und den intrazellulär gelegenen flüssigen Phasen kam, welche eine intrazelluläre Dehydratation mit Anlagerung des Wassers an die extrazellulären Eiskristalle zur Folge hatte. Dieses fortgesetzte langsame Einfrieren führte zu einer Schrumpfung der Zellen und zur Formation immer größer werdender extrazellulärer Eiskristalle (NEI, 1960; MAZUR, 1961; FENNEMA, 1973). NEI et al. (1969) fanden heraus, daß E. c o l i - Zellen, die langsam bei - 25 °C eingefroren wurden, im elektronenmikroskopischen Bild sehr stark geschrumpft waren, wohingehend bei - 150 °C eingefrorene Zellen Hohlräume aufwiesen, die als Zentren intrazellulärer Kristallisation aufzufassen waren. Die Autoren schlossen daraus ebenfalls, daß es bei langsamem Gefrieren zu extrazellulärer und bei schnellem Gefrieren zu intrazellulärer Kristallisation kommt. Auch die Tatsache, daß sich Bakterien beim Gefrieren sehr rasch dehydrieren ließen, war nach Auffassung von RAPPATZ et al. (1966) ein weiterer Hinweis darauf, daß dabei sehr hohe Einfriergeschwindigkeiten angewendet werden müssen, um eine intrazelluläre Kristallisation zu erreichen. SCHMIDT-LORENZ (1974) äußerte die Ansicht, daß eine mechanische Schädigung durch intra- oder extrazelluläre Eisbildung bei Bakterien nur eine geringe Rolle spielt. Vielmehr scheint es infolge der starken Dehydratation der Bakterienzellen beim Gefrieren zu einer Änderung der kolloidalen Struktur, des pH - Wertes sowie einer Konzentration von Elektrolyten und anderen gelösten Stoffen zu kommen. Die Konzentration der gelösten Stoffe ging allerdings mit einer fortschreitenden Eiskristallbildung einher (MORICHI, 1969). Bei hohen Salzkonzentrationen war dann mit einer Denaturierung von Makromolekülen, wie Proteinen und Polypeptiden, zu rechnen (NICKERSON u. SINSKEY, 1972; SCHMIDT-LORENZ, 1974). Auch LOVELOCK (1957) sah die Ursache des Gefrierschadens in der Denaturierung von Lipid-Protein-Komplexen, welche nach BRETZ u. HARTSELL (1959) selbst bei sehr nahe verwand-

ten Subkulturen von E. coli individuelle Merkmale aufwiesen. Dieses führte trotz gleicher Einfrier- und Auftauverfahren zu signifikant unterschiedlichen Reisolierungsraten aus den gefrorenen Substraten.

Die Proteindenaturierung schien bei Temperaturen um - 2 °C wesentlich größer zu sein als bei - 20 °C. Nach HAINES (1938) flockte die Proteinfraktion von Ps. aeruginosa bei - 2 °C sehr schnell aus, jedoch nicht bei - 20 °C. Offenbar führte vor allem der Verlust der für die native Proteinstruktur notwendigen Hydrathüllen zu einer irreversiblen Aggregation von Proteinmolekülen, die auch beim Wiederbefeuchten nicht rückgängig gemacht werden konnte (LUYETT, 1962). Ähnliche Vorgänge schienen auch bei der Einwirkung von Hitze auf S. typhimurium abzulaufen (PIERSON, 1971). Durch steigende Konzentrationen bestimmter gelöster Stoffe in noch nicht ausgefrorenem Wasser, wie z.B. Zucker, konnte die Resistenz der den Gefrierprozeß überlebenden Mikroorganismen erhöht werden (POSTGATE u. HUNTER, 1961; NEI, 1964; HERRMANN, 1970). Dieser Umstand zeigte sich auch beim Überleben von Bakterien in Speiseeis (WALLACE, 1938). Bei Entzug des ungefrorenen Wassers fielen die Überlebensraten der Mikroorganismen jedoch schnell ab (NEI et al., 1965).

c) Einfrier- und Auftauvorgang

Im Hinblick auf die Frage eines keimreduzierenden Effektes auf die in einem Substrat enthaltenen Mikroorganismen ist es wichtig, zu erfahren, welche Einfrier- und Auftaumodifikationen zu einer möglichst hohen Letalitätsrate führen.

Bei Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen mit Reinkulturen verschiedener Bakterien- und Hefearten, die in physiol. NaCl - Lösung aufgeschwemmt, auf ca. 10^3 Keime / ml eingestellt und bei - 24 °C sowie - 193 °C eingefroren wurden, beobachtete STILLE (1950),

daß rasches Einfrieren und langsames Auftauen deutlich schonender als langsames Einfrieren und rasches Auftauen wirkte. Er begründete dieses ebenso wie GISSKE et al. (1964) damit, daß bei sehr schnellem Einfrieren der für die Zellen kritische Temperaturbereich zwischen ± 0 °C und - 10 °C in kürzester Zeit durcheilt würde. Der Autor stellte außerdem experimentell fest, daß das rasche Auftauen der Mikroorganismensuspensionen bei + 25 °C im Wasserbad schädlicher war, als das Auftauen bei - o.5 °C innerhalb von 5 - 6 Stunden. Die zellschonende Wirkung langsamen Auftauens erklärte der Autor mit Phänomenen, wie sie bei Auftauprozessen von Pflanzenzellen sichtbar würden. Beim Einfrieren wurde der Zelle außer dem freien Wasser auch das an Plasmakolloide gebundene Hydratationswasser entzogen und auskristallisiert. Dieser Entzug konnte bei raschem Auftauen nicht wieder rückgängig gemacht werden. Bei langsamem Auftauen konnten die Kolloide jedoch die ursprüngliche Wasserverbindung wieder eingehen, so daß mizellare Verlagerungen und Zerstörungen vermieden wurden. Nach kritischer Betrachtung der Versuche von WEISER u. HARGISS (1946), SATO (1954) und DOEBLER u. RINFRET (1963) stellte MAZUR (1966) fest, daß die Überlebensrate von E. c o l i in einem nicht protektiven Medium groß war, wenn eine hohe Einfriergeschwindigkeit (100 °C / Minute) angewendet wurde. Im Gegensatz zu STILLE (1950) setzte dieser Autor jedoch einen mit gleicher Geschwindigkeit ablaufenden Auftau- oder Erwärmungsprozeß für hohe Überlebensraten voraus. Demgegenüber stellte SCHMIDT-LORENZ (1974), ohne auf individuelle Merkmale einzelner Arten sowie den physiologischen Zustand der Zellen und das Substrat, in dem sie sich befinden, einzugehen, generell fest, daß langsames Einfrieren verbunden mit raschem Auftauen im allgemeinen schonender wirkt als rasches Gefrieren und langsames Auftauen. Auch NICKERSON u. SINSKEY (1972) gelangten zu dem Schluß, daß langsames Gefrieren zu höheren Überlebensraten führt als schnelles Einfrieren. Die zellschonende Wirkung raschen Auftauens wurde von diesen Autoren damit begründet, daß bei einem solchen Verfahren der

schädigende Einfluß der Rekristallisation auf ein Minimum reduziert wird.

Neueste Untersuchungen über den Einfluß der Abkühl- und Erwärmungsrate auf die Überlebensraten von Mikroorganismen haben ergeben, daß Reinkulturen verschiedenster Bakterienarten bei analogen Einfrier- und Auftaugeschwindigkeiten offenbar in gleicher Weise beeinflußt wurden. Im Bereich des langsamen Einfrierens waren die geringsten Absterberaten bei einer Einfriergeschwindigkeit von 8 °C pro Minute zu beobachten. Mehr Keime wurden abgetötet, wenn von dieser Einfriergeschwindigkeit nach oben oder unten abgewichen wurde. Die geringsten Überlebensraten wurden erzielt, wenn mit einer Geschwindigkeit von 100 °C / Minute eingefroren wurde. Die Beschleunigung des Gefriervorganges auf Werte über 100 °C / Minute ließ die Anzahl der überlebenden Keime wieder ansteigen. Nach Steigerung der Gefriergeschwindigkeit auf mehr als 200 °C / Minute war das Absterben der Mikroorganismen vom zeitlichen Ablauf des Erwärmungsprozesses abhängig (CALCOTT u. McLEOD, 1975; CALCOTT et al., 1976). Bei Versuchen mit E. coli kamen CALCOTT u. McLEOD (1975) zu dem Schluß, daß bei schnellem Einfrieren und langsamem Auftauen einer sich in Salzlösung befindlichen Zellsuspension das Penetrieren von Zellmaterial aus der Zelle und das Eindringen von Stoffen in die Zelle sowohl auf eine Membran- als auch auf eine Zellwandschädigung hinweisen. Die Autoren machten die Schäden an der Zellmembran für den Gefriertod von Keimen verantwortlich.

d) Gefrierlagerung

Während der Gefrierlagerung wird je nach protektiver Wirkung des betreffenden Substrates ein weiterer Anteil der noch vermehrungsfähigen Mikroorganismen abgetötet (SCHMIDT-LORENZ, 1974). Dabei muß der Grad der Abnahme der Keimzahl während der Gefrierlagerung weiterhin in Abhängigkeit zur Lagertemperatur, Lagerdauer sowie der im Medium vorhandenen Zellkonzentration gesehen werden (MAZUR,

1966). Die Reduktionsraten im Verlauf der Gefrierlagerung variierten bei den einzelnen Keimarten außerordentlich (NICKERSON u. SINSKEY, 1972). Während sich bei Lagertemperaturen knapp unterhalb des Gefrierpunktes bis ca. - 10 °C eine schnelle Abnahme der Keimzahl bemerkbar machte, verringerte sich diese Tendenz bei der Anwendung tieferer Gefriertemperaturen (HAINES, 1938; WEISER u. OSTERUD, 1945; HARTSELL, 1951; INGRAM, 1951; HUCKER, 1954; BORGSTRÖM, 1955; GEORGALLA u. HURST, 1963; ARPAI, 1964; SCHMIDT-LORENZ, 1970, 1974). ROBERTS (1974) berichtete, daß das Überleben von E. coli während der Gefrierlagerung bei - 20 °C etwa 10.000 mal größer war als bei - 2 °C. LINDEBERG u. LODE (1963) stellten fest, daß in einer bei - 79 °C eingefrorenen E. coli - Suspension im Verlauf der Lagerzeit, abgesehen von einer initialen Keimreduzierung, keine weiteren Keimabnahmen zu beobachten waren, während die Keimzahl bei - 26 °C kontinuierlich sank. Bei Versuchen mit E. coli und Ps. fluorescens fand ARPAI (1962) heraus, daß Gefrierschaden und Gefriertod in stärkerem Maße zu Beginn der Lagerzeit auftraten und daß sie eng verknüpfte Bestandteile eines ständig fortlaufenden Prozesses waren. Eine Reduzierung der Keimzahl bei der Verwendung sehr tiefer Gefrierlagertemperaturen ist nicht zu erwarten, da solche Temperaturen ja sogar zur Erhaltung lebensfähiger Zellkulturen dienen (ROBERTS, 1974). Dennoch läßt sich nicht folgern, daß die Gefrierlagerung eines Lebensmittels zwischen - 2 °C und - 10 °C vom mikrobiologischen Standpunkt aus zu empfehlen ist. Bei Untersuchungen von dreißig verschiedenen handelsüblichen tiefgefrorenen Lebensmitteln und Fertiggerichten, die bei konstanten Temperaturen zwischen - 2.5 °C und - 10 °C gelagert worden waren, stellten SCHMIDT-LORENZ (1963) und SCHMIDT-LORENZ u. GUTSCHMIDT (1968, 1969) fest, daß sich nach mehrwöchiger Lagerung bis - 5 °C eine Mischflora kältetoleranter Bakterien und Hefearten entwickelte, wohingegen sich zwischen - 5 °C und - 10 °C eine überwiegende Hefeflora an der Oberfläche der Lebensmittel ausbildete. Obwohl ein Teil dieser Aerobenflora durch Austrocknung zugrunde ging, blieben die in das Sub-

strat ausgeschiedenen Enzyme und Stoffwechselprodukte aktiv und bauten das Lebensmittel enzymatisch ab. Die Einwirkung dieser saprophytischen Mikroflora führte oft zum nicht unerheblichen mikrobiellen Verderb des gefrorenen Substrates, was beim Wachstum von mycotoxinbildenden Pilzen zudem für die menschliche Gesundheit bedenklich werden kann (SCHMIDT-LORENZ, 1974).

e) Protektive Wirkung des Substrates

Für die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen bei der Einwirkung von Gefriertemperaturen sind protektive bzw. destruktive Bestandteile des Substrates, in dem sie sich befinden, von größter Bedeutung (SCHMIDT-LORENZ, 1974). BORGSTRÖM (1961) und SCHMIDT-LORENZ (1974) sind der Ansicht, daß sowohl beim eigentlichen Gefriervorgang als auch bei längerer Gefrierlagerung alle anderen Faktoren, die eine Wirkung auf die Keime ausüben können, zurücktreten.

Die Mechanismen der Gefrierschutzwirkung sind vielfältig und ebenso unzureichend geklärt wie die des Gefriertodes. BORGSTRÖM (1961) beschrieb die zahlreichen Vorstellungen über die Wirkung protektiver Substanzen als:

1. osmotische Veränderungen
2. Wasserbindung
3. Fett oder anderen Schmierfilm auf der Oberfläche der Bakterienmembran
4. physikalische oder chemische Zusammensetzung des Substrates
5. Bildung von Wasser - Fett - Phasen (Butter)

und 6. Viskositätsänderungen.

FENNEMA (1973) teilte ebenfalls einige Hypothesen mit, von denen die 'Salz - Puffer - Methode' am weitesten erforscht ist. Diese Hypothese besagt, daß die durch das Gefrieren bedingte Konzentration von Salzlösungen innerhalb der Zellen direkt oder indirekt die Zellmembranen

schädigen kann. Durch die Hinzufügung von neutralen Lösungen, wie z.B. Glycerol, wird das Ansteigen der Elektrolytenkonzentration verhindert. Glycerol dient somit als 'Salzpuffer' und ist daher ein 'cryoprotectant'. Derartige protektive Substanzen können sowohl gegen die schädigenden Wirkungen des Einfriervorganges als auch der Gefrierlagerung wirksam werden (MAZUR, 1966). Als Schutzstoffe wurden beschrieben:

Milchprotein	ARPAI, 1962; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; MOSS u. SPECK, 1963
Gelatine	SQUIRES u. HARTSELL, 1955
Mucin	YURCHENKO et al., 1954
Fleischextrakt	ARPAI, 1962
Serum	CLEMENT, 1961

Außer diesen hochmolekulraen Schutzstoffen wurden von CHRISTOPHERSEN (1968) und FENNEMA (1973) in Übersichtstabellen auch niedermolekulare Stoffe wie Glycerol, mehrwertige Alkohole, Salze und Ascorbinsäure aufgeführt. Die verschiedenen Zucker können in Abhängigkeit von ihrer Konzentration sowohl protektiv als auch destruktiv wirken. Während bei Saccharose, Glukose und Laktose Schutzwirkungen gegen den Einfriervorgang bestehen sollen (MAZUR, 1966), stellten CLEMENT (1961) und POSTGATE u. HUNTER (1961) während der Gefrierlagerung eher einen schädigenden Einfluß auf E. coli und Aerob. aerogenes fest. Dieser äußerte sich in verminderten Reisolierungsraten gegenüber reinem Wasser. CALCOTT u. McLEOD (1975) stellten bei schnellem Einfrieren und langsamem Auftauen einer salzigen E. coli - Suspension fest, daß 96.9 % der Keime abgetötet wurden. Der Zusatz von 1%-igem TWEEN 80 verhinderte nur die Schäden an der Bakterienmembran, während die Zugabe von 3 % Glycerol zu fast vollständigem Überleben der Population während der Gefrierlagerung führte. In einem anderen Versuch, bei dem die protektive Wirkung einiger Stoffe bei unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten beobachtet werden sollten, erwiesen sich Glycerol und

Saccharose in einem Einfriergeschwindigkeitsbereich von 6 °C bis 6000 °C / Minute als gut schützend (CALCOTT u. Mc LEOD, 1974).

In Lebensmitteln sind protektive Stoffe in mehr oder weniger hohen Konzentrationen vorhanden. Die Beurteilung des Umfanges der protektiven Wirkung des Substrates ist unabhängig von anderen Einflußfaktoren deshalb schwierig, weil jedes Lebensmittel anders zusammengesetzt ist (SCHMIDT-LORENZ, 1974). Die Wirkungen können sogar beim gleichen Substrat unterschiedlich sein. DIGIROLAMO et al. (1970) mischten eine Suspension von S. d e r b y und S. t y p h i m u r i u m in den Intestinaltrakt von Pazifikaustern ein. Es zeigte sich, daß das Austernhomogenisat bei einer Gefriertemperatur von - 18 °C eine höhere Schutzwirkung aufwies als die Originalaustern. Schützende Substanzen sind jedoch nicht nur auf die in einem Substrat enthaltenen Stoffe beschränkt, sondern können auch von den Mikroorganismen selbst gebildet werden. SCHMIDT-LORENZ (1974) berichtete über schleimbildende Leuconostoc- und Lactobacillus - Arten sowie stark schleimende Enterobacter-, Klebsiella- und Erwinia - Arten, die auch nach mehrmonatiger Lagerung bei tiefgefrorenem Gemüse dominant vorlagen.

f) Destruktive Wirkung des Substrates und Einfluß des pH - Wertes

Stark destruktiv auf die im Substrat vorhandenen keime wirken saure Reaktionsbedingungen (SCHMIDT-LORENZ, 1974). Stark saure und gefrorene Lebensmittel sind daher hygienisch ziemlich sicher, da pathogene und toxigene Mikroorganismen beim Gefriervorgang weitgehend abgetötet werden (McCLESKEY u. CHRISTOPHER, 1941). Die Wirkung einer Säure auf die im Substrat befindlichen Keime setzt sich aus drei Faktoren zusammen:

1. dem pH - Wert als solchem, d.h. der freien Wasserstoffionenkonzentration,

2. der Höhe des undissoziierten Anteiles der vorhandenen Säure bzw. bei mehrbasischen Säuren den Anteilen an verschiedenen Dissoziationsstufen,

und 3. der spezifischen antimikrobiellen Wirksamkeit der undissoziierten Säure oder der Dissoziationsstufen (LUBENIECKI u. SCHELHORN, 1972).

Es wurde weiterhin angenommen, daß die Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen-Arten oder -Gruppen unterschiedlich ist (LUBENIECKI u. SCHELHORN, 1972). Auch die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen zur Konservierung von Lebensmitteln verwendeten Säuren war unterschiedlich und machte im Zusammenhang mit den Ausgangskeimzahlen im Substrat sowie der angewendeten Temperatur die Wachstumshemmung aus (CHUNG u. GOEPFERT, 1972). Bei der Überprüfung des kombinierten Einflusses von Temperatur, Kochsalz und pH - Wert auf Wachstum und Überlebensfähigkeit von 23 Salmonella-Stämmen in Nährbouillon (pH 5.o, 5.8 und 6.5) beobachteten ALFORD u. PALUMBO (1969) bei + 30 °C ein Wachstum innerhalb des gesamten pH - Bereiches, welches bei Senkung der Temperaturen in Abhängigkeit zur Kochsalzkonzentration nur noch bei wenigen Kombinationen stattfand. In gewolftem Schweinefleisch zeigte sich bei + 4 °C kein Wachstum von Salmonellen mehr, hingegen wurde bei + 10 °C und einem Kochsalzgehalt von 3.5 % (pH 5.7 - 6.2) eine Vermehrung beobachtet, die bei Erhöhung der Salzkonzentration auf 5.o % jedoch unterblieb. RIECHERT (1940) konnte im pH - Bereich von 5.o bis 8.6, wie er normalerweise im Fleisch vorliegen kann, bei Kühltemperaturen keine Wachstumsunterschiede nachweisen. Demgegenüber ermittelten GEORGALLA u. HURST (1963) bei der Beimpfung von Hackfleisch mit Salmonellen mit abnehmenden pH - Werten unterhalb von 6.o zunehmend niedrigere Reisolierungsraten nach dem Gefriervorgang. KHAN u. KATAMAY (1969) konnten nach Zugabe von niedermolekularen Fettsäuren zu künstlich mit Salmonellen infiziertem Fleisch keine lebenden Keime mehr feststellen. Daher wiesen sie

auf die Möglichkeit hin, daß diese natürlich vorkommenden und nicht toxischen Stoffe als eine Art Konservierungsmittel angesehen werden könnten.

g) Einfluß der Zellkonzentration

Eine weitere Einflußmöglichkeit auf den Grad der Abtötung von Mikroorganismen durch das Gefrieren kann die initiale Zellkonzentration im Substrat sein. In dieser Frage bestehen gegenteilige Ansichten, wobei einige Autoren diesen Einfluß ablehnen, während andere ihn als gegeben betrachten. MAJOR et al. (1955) und BRETZ (1961) untersuchten das Überleben verschieden dicht eingestellter Suspensionen von E. coli im Bereich von 10^6 - 10^9 Keimen / ml bei Temperaturen von - 9 °C und - 22 °C und machten die Beobachtung, daß die auf 10^9 Keime / ml eingestellten Suspensionen eine Lagerzeit von 7 Tagen wesentlich besser überstanden. Es wurde angenommen, daß die geringe Keimabnahme bei hohen Zellkonzentrationen der Schutzwirkung von gelösten Stoffen, die von den geschädigten Zellen freigesetzt worden waren, zuzuschreiben war. Solche gelösten Stoffe können z.B. Proteinstoffwechselprodukte sein, die sogar zur Wiederbelebung der durch das Gefrieren geschädigten Keime beitrugen (MOSS u. SPECK, 1963). Auch RACCACH u. JUVEN (1973) fanden höhere Überlebensraten einer auf 10^8 Keime / ml eingestellten S. gallinarum - Suspension gegenüber einer solchen, die nur 10^4 Keime / ml enthielt. Es wurde bei diesem Versuch mit einer Einfriergeschwindigkeit von 18 °C / Minute auf - 40 °C herabgekühlt. Im Gegensatz dazu berichteten RECORD u. TAYLOR (1953) über identische Reduktionsraten beim Gefrieren von E. coli - Suspensionen im Bereich von 10^4 - 10^{10} Keimen / ml. PACKER et al. (1965) vertraten die Ansicht, daß die hohe Sensibilität von E. coli gegenüber dem Gefrierprozeß von der Verdünnung der Nährstoffe im erschöpften Wachstumsmedium abhängt. Dieses schlossen die Autoren aus dem Umstand, daß Zellsuspensionen zwischen 10^4 und 10^9 Keimen / ml konstante

Empfindlichkeit gegenüber Einfrieren und Auftauen aufwiesen, wenn sie in einem zellfreien erschöpften Wachstumsmedium verdünnt und anschließend eingefroren wurden. BORGSTRÖM (1961) nahm einen Einfluß der Höhe der Ausgangszellkonzentration zwar an, gab aber zu bedenken, daß dieser Einfluß leicht durch überlagernde Effekte des vielen Einflüssen unterliegenden Gefrierprozesses verwischt werden kann.

h) Wachstumsstadium der Zellkulturen

Es wird allgemein angenommen, daß die Wachstumsphase einer Mikroorganismenkultur die Keimzahlreduktion durch das Gefrieren entscheidend beeinflußt. Deutlich unterschiedliche Reisolierungsraten dürften jedoch nur bei gleichalten vegetativen Zellkulturen, die in Reinkultur vorliegen, sicher zu ermitteln sein, da sich in einem Lebensmittel gewöhnlich Mikroorganismen verschiedener Entwicklungsstadien gleichzeitig befinden (BORGSTRÖM, 1961).

Bis heute wird von zahlreichen Autoren die Ansicht vertreten, daß physiologisch junge Zellen - d.h. in der frühen log-Phase befindliche - sensibler sind als physiologisch ältere (GORRIL u. McNEIL, 1960; STRANGE u. NESS, 1963; MAZUR, 1966; JOHANNSEN, 1972; MARTH, 1973; NICKERSON u. SINSKEY, 1972; SCHMIDT-LORENZ, 1974). HEGARTHY u. WEEKS (1940) und TOYOKAWA u. HOLLANDER (1956) stellten dieses auch bei E. coli fest, bei dem eine für längere Zeit bei $\pm$ 0 °C vorgekühlte, in der log-Phase befindliche Kultur anfälliger für die angewendeten Gefriertemperaturen war. NACKEBIJA (1975) bemerkte bei 18 bis 20 Stunden alten Kulturen von Cl. perfringens, die bei - 3 °C bis - 4 °C eingefroren und sechs Monate gelagert wurden, weder eine Abtötung noch eine Veränderung der morphologischen, kulturellen, biochemischen oder virulenten Eigenschaften der Keime. Einfrieren von 4 Stunden alten Kulturen führte hingegen zu einem Virulenzverlust des Erregers, ohne jedoch seine anderen Eigenschaf-

ten zu beeinflussen. MEYNELL (1958) stellte eine erhöhte Empfänglichkeit für schädigende Einflüsse des Gefriervorganges auf physiologisch junge E. coli-Kulturen fest. Er bemerkte jedoch, daß dieser Effekt Schwankungen unterworfen sein kann, wenn nicht alle Keime der Population die gleichen Ansprüche an die im Verdünnungsmedium enthaltenen Nährstoffe stellen.

i) Pathogenität und Virulenz

Noch nicht hinreichend geklärt ist, in welchem Umfange sich Pathogenität und Virulenz von Mikroorganismen nach Einfrieren und Auftauen verändern. SIMON et al. (1963) fanden heraus, daß gefriergetrocknete S. typhimurium-Zellen noch nach 1-2 Jahren für Mäuse virulent waren. Aus den Versuchen von TOSCHKOFF et al. (1965) wurde bekannt, daß es bei S. typhimurium in durchgedrehtem Kaninchenfleisch nach Lagerung bei ± 0 °C bis + 2 °C zu einer Virulenzsteigerung um das 30.000-60.000-fache kam. Diese Virulenzsteigerung trat gegenüber den bei Zimmertemperatur gelagerten Proben verzögert (nach 48-72 Stunden) auf. Die Verfasser schlossen daraus, daß der hygienische Effekt einer verminderten oder fehlenden Vermehrung von Salmonellen bei Kühltemperaturen durch die erhöhte Virulenz der Erreger wettgemacht wird. Diese Ergebnisse wurden von KALOYANOV (1972) für verschiedene Salmonella-Stämme bestätigt. Die Virulenzsteigerung war nicht mit morphologischen oder serologischen Veränderungen der Prüfstämme gekoppelt, jedoch wiesen einige Salmonella-Species unterschiedliche enzymatische Aktivitäten auf, die aber keine strenge quantitative Korrelation zur Virulenzrate hatten. SORELLS et al. (1970) berichteten, daß durch den Gefriervorgang die Infektiosität von S. gallinarum offenbar nicht beeinflußt wurde. Bei einer intraperitoneal infizierten Kükenpopulation zeigte sich bei den Tieren keine unterschiedliche Letalitätsrate zwischen der Applikation einer unbehandelten Salmo-

nellasuspension und einer zur Selektion eines subletal geschädigten Anteils mit Penicillin behandelten Suspension. In diesem Zusammenhang gaben die Arbeiten von IDZIAK u. SUVANMONGKOL (1972) und IDZIAK u. CROSSLEY (1973) erste Hinweise auf das Vorhandensein einer engen Verbindung zwischen dem Alter einer Kultur, der Beschaffenheit und dem pH-Wert eines damit beimpften Substrates und der LD_{50} einer Kükenpopulation.

j) Subletale Schädigung von gefrierbehandelten Mikroorganismen

Für die Beurteilung der hygienischen Qualität eines gefrierbehandelten Lebensmittels ist es wichtig, alle vorhandenen pathogenen Mikroorganismen zu erfassen (SCHMIDT-LORENZ, 1970, 1974). Es wird angenommen, daß sowohl in tiefgefrorenen (STRAKA u. STOKES, 1959; ARPAI, 1962; McLEOD et al., 1966; SCHMIDT-LORENZ, 1974) als auch in gefriergetrockneten Substraten (BAIRD-PARKER u. DAVENPORT, 1965; SINSKEY et al., 1967; MOSSEL u. RATTO, 1970), ein gewisser Anteil an keimen vorliegt, der durch den Gefrierprozeß subletal geschädigt ist. Der Prozentsatz an geschädigten Zellen einer Population kann zwischen 40 und 90 % betragen (STRAKA u. STOKES, 1959; RAY u. SPECK, 1972; JANSSEN u. BUSTA, 1973) und variiert mit der Zeit und der Temperatur der Gefrierlagerung, der Zellart, der Zusammensetzung des Suspensionsmediums sowie dem Zeitraum der zwischen dem Auftauen und der Kultivierung auf Festmedien vergeht (BRETZ u. HARTSELL, 1959; STRAKA u. STOKES, 1959; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; RAY u. SPECK, 1973). Der Mechanismus der subletalen Schädigung ist vielfältig. Sie kann nicht nur beim Gefrieren sondern bei allen, die natürlichen Lebensbedingungen von Mikroorganismen beeinträchtigenden Vorgängen auftreten. Morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung oder Zellschwellung sowie Veränderungen im Anfärbeverhalten sind möglich (SATO, 1958; NEI, 1960; TOMLINS

u. ORDAL, 1970). Weiterhin können Permeabilitätsveränderungen an den Zellwänden der Keime auftreten, die sich im Auftreten von intrazellulär gelösten Stoffen im umgebenden Medium äußern (MAZUR, 1966; MORICHI, 1969; LEWICKI u. SILVERMAN, 1969). Auch die Synthesefähigkeit bestimmter essentieller Zellbestandteile sowie die Organisation der Proteinsynthese kann vorübergehend gestört sein (STRAKA u. STOKES, 1959; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; LEWICKI u. SILVERMAN, 1969; SCHMIDT-LORENZ, 1970, 1974). Durch die Untersuchungen von KOHN (1960), RAY et al. (1971) und RAY u. SPECK (1972) wurde bekannt, daß gefriergeschädigte E. coli- sowie S. anatum-Zellen eine defekte Lipopolysaccharidfraktion der Zellwand aufwiesen, was bei E. coli zu einer gesteigerten Lysozymempfindlichkeit nach dem Auftauen führte.

Ob eine Gefrierschädigung auch eine Mutation der Keime zur Folge haben kann, ist noch nicht hinreichend erforscht. Während McLEOD et al. (1966) und SORELLS et al. (1970) keine stabilen auxotrophen Mutanten von E. coli, A erob. aerogenes und S. gallinarum fanden und daher, ebenso wie ASHWOOD-SMITH (1965) die Meinung vertraten, daß Gefrieren und Auftauen nicht mutagen wirken, konnten POSTGATE u. HUNTER (1963) drei auxotrophe Mutanten in einer gefrierbehandelten Aerob. aerogenes-Population finden. Die Autoren schlossen daraus allerdings nicht auf eine signifikante Mutation durch den Gefrierprozeß.

Die subletal geschädigten Keime lassen sich mit Hilfe konventioneller Nachweismethoden nicht erfassen (SCHMIDT-LORENZ, 1970). MAZUR (1966) nannte aus diesem Grund als Merkmal für ungeschädigte Mikroorganismen, daß sie in der Lage sind, sich nach dem Gefrierprozeß so zu vermehren, daß auf einem geeigneten Nährboden sichtbare Kolonien gebildet werden. Der verwendete Nährboden muß in erster Linie den erhöhten Nährstoffansprüchen der durch das Gefrieren angegriffenen Zelle genügen (STRAKA u. STOKES, 1959; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; POSTGATE u. HUNTER,

1963). Gefrierbehandelte Salmonellen und Coliforme reagieren auf Hemmstoffe in ansonsten komplexen Nährmedien außerordentlich empfindlich. Diese Empfindlichkeit gegen Selektivmedien äußert sich in stark verminderten Reisolierungsraten aus gefrorenen Substraten, weshalb diese Nährböden nicht angewendet werden sollten (GUNDERSON u. ROSE, 1948; HARTSELL, 1951; HARRIS, 1963; RAY et al., 1971; v. SCHOTHORST u. v. LEUSDEN, 1972; RACCACH u. JUVEN, 1973; JANSSEN u. BUSTA, 1973; SIEMS, 1974). Beim Vorliegen geschädigter Zellen kann die Reisolierungsrate auf einem Selektivmedium bis auf 10 % der Rate eines nichtselektiven Mediums absinken (MAXCY, 1970).

k) Aufhebung der subletalen Schädigung

Die Kälteschädigung der Mikroorganismen kann jedoch mithilfe geeigneter Methoden weitgehend aufgehoben werden (WARSECK et al., 1973; EDEL u. KAMPELMACHER, 1973; SIEMS, 1974; SCHMIDT-LORENZ, 1974). Bei der Reorganisation kommt es nach einer längeren Latenzphase durch die in dem komplexen Nährsubstrat enthaltenen Stoffe zu einer Wiederbelebung ('resuscitation') der Keime, wobei die ribosomale RNS regeneriert wird. Nachdem die ATP - Synthese (Energiesynthese) wieder in Gang gesetzt ist, beginnt auch die Proteinsynthese und der Aufbau der DNS (TOMLINS u. ORDAL, 1971; RAY et al., 1971, 1972; JANSSEN u. BUSTA, 1973; SIEMS, 1974). RAY et al. (1971) betonten, daß der wichtigste Regenerationsschritt die ATP - Synthese ist, während der das ATP durch oxidative Phosphorylierung gebildet wird. Die zur Aufhebung der Stoffwechselschäden benötigten Stoffe bestehen aus den verschiedensten Komponenten.

Der in Peptiden enthaltene Stickstoff schien dabei zumindestens für eine Vielzahl gram-negativer Enterobacteriaceae von großer Bedeutung gewesen zu sein (MOSS u. SPECK, 1966; SPECK u. COWMAN, 1969). SIEMS (1974)

nannte als weitere Nährstoffzusätze Hämatin, Pyruvat sowie Fleisch- und Hefeextrakte. Von den Bestandteilen der Milch schienen vor allem die Milchsalze und von diesen das Phosphat den größten Effekt gehabt zu haben (JANSSEN u. BUSTA, 1973). Die Resuscitation mithilfe von anorganischem Phosphat hing allerdings von dessen Konzentration, dem pH-Wert und der Temperatur im Erholungsmedium ab (RAY u. SPECK, 1972). Während EDEL u. KAMPELMACHER (1973) zur Erholung subletal geschädigter Keime eine Voranreicherung mit gepuffertem Peptonwasser vorschlugen, hielten andere Autoren Laktose-Bouillon für wirksamer (THATCHER u. CLARK, 1968; NICKERSON u. SINSKEY, 1972). SIEMS (1974) registrierte gleichwertige Ergebnisse mit gepuffertem Peptonwasser und Trypton-Soja-Bouillon. Nach der Erholung der Keime konnten Selektivnährböden wiederum unbedenklich verwendet werden (NICKERSON u. SINSKEY, 1972; EDEL u. KAMPELMACHER, 1973). Zur Regeneration geschädigter Zellen aus gefrorenen Lebensmitteln bot SCHMIDT-LORENZ (1974) ein einfaches Verfahren an. Dabei sollten die zu untersuchenden Lebensmittel nicht aufgetaut werden, sondern mit geeigneter Verdünnungslösung im Verhältnis 1 : 5 homogenisiert werden. Unmittelbar danach erfolgte die Bestimmung der Gesamtkeimzahl. Anschließend blieb das Homogenisat nach dem Vorschlag von MOSSEL u. RATTO (1970) in einem Gefäß mit möglichst großer Oberfläche für genau 2 Stunden bei 20 °C stehen. Im Anschluß daran erfolgte die Aussaat auf die üblichen Selektivmedien. Wenngleich BRETZ u. HARTSELL (1959) und SPECK et al. (1975) zu bedenken gaben, daß nach dem Gefrieren in aufgetauten Zellen einige Stoffwechselvorgänge schneller als andere ablaufen können, was zu einer intrazellulären Konkurrenz bestimmter Kofaktoren und unausgeglichenem Wachstumsbeginn führen kann, so ist nach Aussage von WARSECK et al. (1973) und SCHMIDT-LORENZ (1974) innerhalb von 90 - 120 Minuten nicht mit einem Wachstumsbeginn zu rechnen. Jedoch schienen die Regenerationszeiten einzelner Keime erhebliche Differenzen aufzuweisen. v. SCHOTHORST u. v. LEUSDEN (1975) stellten bei geschädigten Salmonellen aus Trockenmilchpulver Wiederbelebungs-

zeiten zwischen 2 und 18 Stunden fest.

Für die quantitative Bestimmung des Anteils subletal geschädigter Keime aus einem gefrorenen Substrat werden Verfahren angewandt, die davon ausgehen, die stoffwechselgeschädigten Mikroorganismen numerisch aus der Differenz zwischen der Keimzahl auf einem komplexen Nährboden und einem Nährmedium mit geringem Nährstoffangebot zu ermitteln. Diejenigen Keime, die gleich nach dem Auftauen auf keinem der beiden Nährböden mehr wachsen, wurden als abgetötet betrachtet (STRAKA u. STOKES, 1959; SORELLS et al., 1970). Als komplexer Nährboden wurde oftmals der Trypticase - Soja - Agar (TSA) verwendet (STRAKA u. STOKES, 1959; SORELLS et al., 1970; SPECK et al., 1975). Für die Unterdrückung der bei kommerziell gefertigten Tiefkühlprodukten stets auftretenden Begleitflora, die einen hemmenden Einfluß auf die Reisolierung eventuell vorhandener pathogener Enterobacteriaceae ausüben könnte, empfahlen SPECK et al. (1975) die Überschichtung des Regenerationsmediums TSA mit Violet - red - bile - Agar (VRBA).

2. Verhalten von Salmonellen in gefrorenen Substraten

Die Beschaffenheit des umgebenden Substrates, Einfrier- und Gefrierlagerzeiten sind nach PABLO et al. (1967), SCHMIDT-LORENZ (1974) und NOSKOWA (1976) ähnlich wie für andere Enterobacteriaceae limitierende Faktoren für die Überlebensraten von Salmonellen, wobei stammspezifisch unterschiedliche Gefrierresistenzen besondere Berücksichtigung finden müssen (HARTSELL, 1951; AEA u. BUSHNELL, 1962). Untersuchungen über den Einfluß dieser Faktoren wurden schon frühzeitig durchgeführt. PRUCHA u. BRANNON (1926) stellten bei einer 12 % Zucker und 10 % Fett enthaltenden Eiscreme, in die S. typhi eingemischt wurde, nach 10 Tagen Gefrierlagerung bei - 18 °C

eine Reduktion der Keime um 90 % fest. Allerdings waren sogar nach 2 Jahren, wenn auch nur noch in geringer Zahl, Salmonellen nachzuweisen. Auch SADEK et al. (1973) bemerkten nach dem Einfrieren eines künstlich mit Salmonellen inokulierten Eismixes eine initiale Keimabnahme um 65 % während der ersten 3 Wochen der Gefrierlagerung bei - 20 °C. Da die Ausgangskeimzahl im ungefrorenen Eismix jedoch außerordentlich hoch war, hätten die nach Beendigung der Untersuchung nach 12 Monaten noch vorhandenen Salmonellen ausgereicht, um bei einem disponierten Menschen eine schwerwiegende Salmonellose hervorzurufen. WALLACE (1938) konnte in Eiscreme, die bei - 23.2 °C gelagert wurde, sogar noch nach 7 Jahren lebensfähige Salmonellen nachweisen. In Fruchtsäften überlebten die Erreger bei Temperaturen zwischen - 18 °C und - 40 °C bis zu 3 Monate (WALLACE u. PARK, 1933). Im Gegensatz dazu konnten HAHN u. APPLEMAN (1952) bereits nach 24 - stündiger Gefrierlagerung bei - 17 °C keine überlebenden S. typhi-Keime in Orangensaft mehr feststellen. Als Grund für das rasche Absterben der Erreger wurden der stark saure pH-Wert sowie toxische Öle in der mitverarbeiteten Orangenschale angegeben. Auch in künstlich mit S. typhimurium beimpfter Butter konnten im Verlauf einer zehnwöchigen Gefrierlagerung bei Temperaturen zwischen - 12 °C und - 18 °C signifikante Abnahmen der Keimzahl bemerkt werden (SIMS et al., 1968). Als gefrierresistent erwies sich S. typhimurium in ägyptischem Joghurt. Nach 68 Tagen Lagerung bei - 10 °C waren kaum Keime abgetötet worden (GHONIEM et al., 1971). In künstlich mit verschiedenen Salmonella - Serotypen beimpften Nüssen war nach Lagerung bei - 7.5 °C und - 18 °C nach 32 Wochen ebenfalls nur eine geringe Keimreduktion zu registrieren (BEUCHAT u. HEATON, 1975). SCHITTENHELM (1964) untersuchte das Verhalten von S. typhimurium in verschiedenen Flüssiglebensmitteln wie z.B. Milch, Vanillesauce mit Ei und Karottensaft. Diese wurden bei - 10 °C eingefroren und gelagert. Hierbei war zu beobachten, daß innerhalb von 24 Stunden nach Einbringen der Substrate in die Tief-

kühltruhe, ein starker Keimabfall eintrat. Im Verlauf der folgenden 7 Untersuchungstage wurden die Keime allerdings aus keinem der Untersuchungsmaterialien vollständig eliminiert. Dagegen berichteten RAJ u. LISTON (1961), daß S. typhimurium in einer Herz-Hirn-Brühe nach einer Gefrierlagerzeit von 393 Tagen bei -18 °C fast vollständig abgestorben war. Als der gleiche Stamm in ein Fischhomogenisat eingemischt wurde, konnte zunächst ein schnelles Absinken der Keimzahl zu Beginn der Gefrierperiode bemerkt werden, welches sich dann abschwächte. Dieses Absterbeverhalten für S. typhimurium bei -18 °C ermittelten auch PROCTOR u. PHILLIPS (1948) und WOODBURN u. STRONG (1960). Entsprechende Befunde erhoben - bei jeweils -25.5 °C - GUNDERSON u. ROSE (1948) für S. typhi, S. newington und S. gallinarum in so unterschiedlichen Substraten wie gekochtem Reismehl, Lachs in Sahnesauce sowie verschiedenen Hühnerfleischgerichten.

Sehr sensibel gegen den Einfrierprozeß bei -35 °C waren S. typhimurium und S. derby in Pazifikaustern. Nach 24 Stunden waren bereits 95 % einer künstlich inokulierten Population abgetötet. Nach 7 Tagen konnte nur noch 1 % der vor dem Gefrieren vorhandenen Keime reisoliert werden (DIGIROLAMO, 1970).

Einige Autoren überprüften auch das Überleben von Salmonellen auf der Oberfläche und in der Tiefe von Muskel- und Hackfleischproben. Außerordentlich unterschiedliche Keimabnahmen bei der Einmischung von 23 Salmonella-Serotypen in Hackfleisch und anschließender Lagerung bei -18 °C stellten ALFORD u. KNIGHT (1970) fest. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich zudem die Tendenz einer erhöhten Gefrierempfindlichkeit wenig isolierter gegenüber oft isolierten Salmonella-Stämmen (ENKIRI u. ALFORD, 1971). HARTSELL (1951) tauchte steril mit einem Korkbohrer gewonnene Rindfleischstücke in eine Keimsuspension mit bekannter Dichte, die S. aertrycke, S. typhi und S. oranienburg enthielt. Nach Einfrieren bei -25 °C

wurden die Proben nach 4 Stunden in Truhen mit Temperaturen von - 9 °C und - 18 °C umgelagert. Dabei waren die größten Keimabnahmen im ersten Drittel der achtmonatigen Lagerdauer zu verzeichnen, wobei die Keime bei - 9 °C stärker als bei - 18 °C reduziert wurden. BUTTIAUX (1972) beimpfte Rinder- und Schweinemuskelfleisch mit S. brandenburg und S. typhimurium und fror und lagerte die Proben bei - 15 °C. Er bemerkte bei S. typhimurium in Rindfleisch nach 90 Tagen einen Abfall um etwa eine Zehnerpotenz. Die Keimzahl im Schweinefleisch ging dagegen lediglich von 7.4×10^4 auf 4.1×10^4 Salmonellen pro Gramm zurück. Bei dem mit S. brandenburg beimpften Schweinefleisch trat nach 48 Stunden sogar eine Erhöhung des Keimgehaltes um fast eineinhalb Zehnerpotenzen (von 8.5×10^4 auf 1.2×10^6 Keime / g) auf. Eine derartige Keimerhöhung wurde auch bei dem mit dem gleichen Stamm beimpften Rindfleisch in geringerem Ausmaß sichtbar. Eine aussagekräftige Reduzierung von S. brandenburg konnte im Verlauf dieser Untersuchungen während einer dreimonatigen Gefrierlagerung nicht bemerkt werden (Tabelle 2).

GEORGALLA u. HURST (1963) stellten nach dem Einfrieren von künstlich mit S. typhimurium infiziertem Rinderhackfleisch auf - 20 °C einen starken initialen Keimabfall auf ca. 50 % des Ausgangswertes fest; nach einem Zeitraum von 90 Tagen bei dieser Temperatur war der Salmonellengehalt im Substrat jedoch fast unverändert. Ein Einfriervorgang bei - 2 °C bewirkte zwar keinen Abfall der Keimzahl durch den eigentlichen Gefrierprozeß, doch sank der Keimgehalt im Verlauf der Gefrierlagerung kontinuierlich ab und hatte nach 90 Tagen 1 % des Ausgangswertes erreicht. ZAWADZKI u. POGORZELSKA (1974, 1975) mischten 24 Stunden alte Keimsuspensionen von S. typhimurium in Rinderhackfleisch und froren 50 g - Portionen in Petrischalen bei - 23 °C ein (Tabelle 3). Durch den Einfrierprozeß wurden nur zwischen 12.5 und 15.2 % der Salmonellen abgetötet. Am Ende einer zehnmonatigen Gefrier-

Tabelle 2

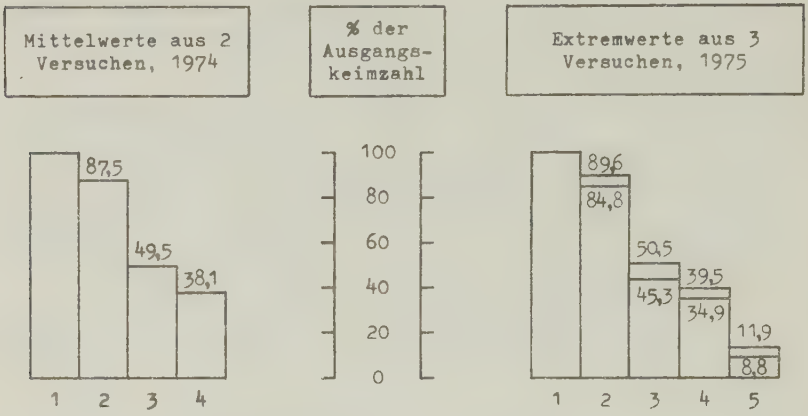
Veränderung der Keimzahlen von Salmonella typhimurium und Salmonella brandenburg in Rinder- und Schweinemuskulatur nach Einfrieren und Gefrierlagerung bei -15 °C (nach M. Buttiaux, 1972)

Keimart	Substrat	Keimzahl / g nach Tagen Lagerdauer		
		0	2	90
Salmonella typhimurium	Rind	$2{,}8 \cdot 10^4$	$1{,}75 \cdot 10^4$	$4{,}2 \cdot 10^4$
	Schwein	$7{,}4 \cdot 10^4$	$4{,}1 \cdot 10^4$	$4{,}1 \cdot 10^4$
Salmonella brandenburg	Rind	$5{,}7 \cdot 10^3$	$6{,}0 \cdot 10^3$	$8{,}65 \cdot 10^3$
	Schwein	$8{,}5 \cdot 10^4$	$1{,}15 \cdot 10^6$	$5{,}75 \cdot 10^4$

Tabelle 3

Keimzahlreduktion durch Gefrieren und Gefrierlagerung bei -23 °C von Salmonella typhimurium (295/52) in Rinderhackfleisch (auf SS-Medium). Alter der eingemischten Keimsuspension 24 Stunden.

(nach Z. Zawadzki und E. Pogorzelska, 2 Vers. 1974, 3 Vers. 1975)



1 = Ausgangskeimzahl vor dem Gefrieren
2 = Keimzahl unmittelbar nach dem Gefrieren
3 = Keimzahl nach ca. 10 Tagen Gefrierlagerung
4 = Keimzahl nach ca. 100 Tagen Gefrierlagerung
5 = Keimzahl nach 263 bis 307 Tagen Gefrierlagerung

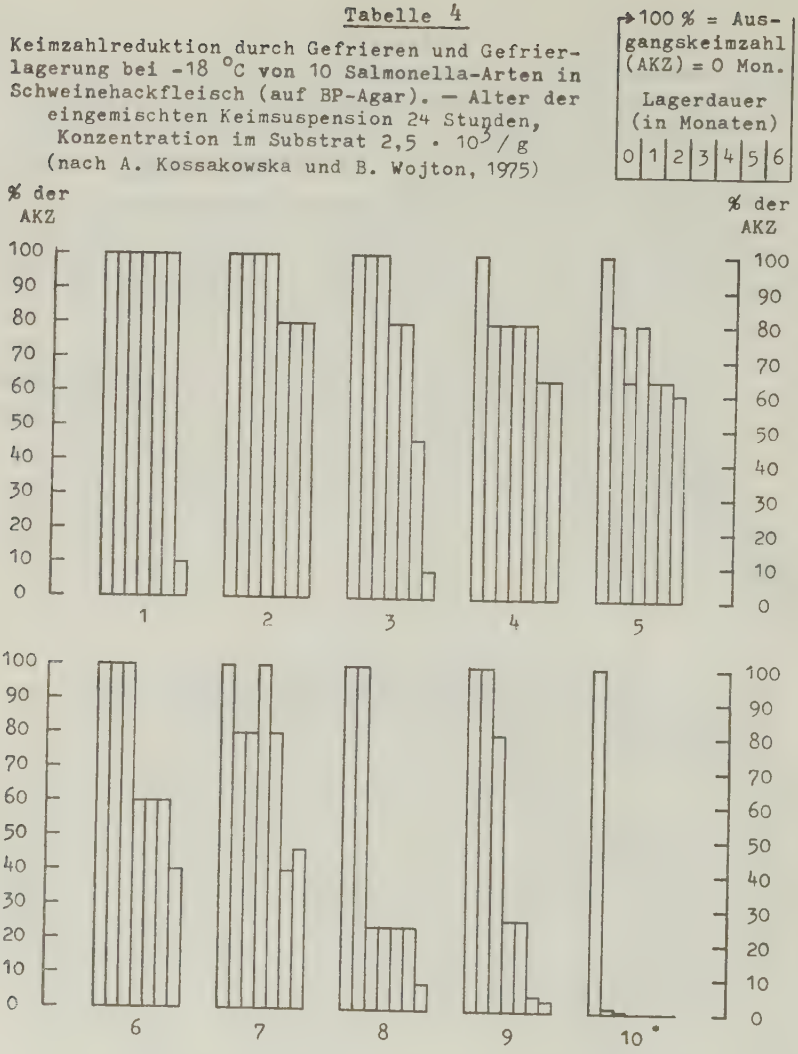
lagerung konnten noch zwischen 8.8 und 11.9 % der Keime aus dem Substrat reisoliert werden. KOSSAKOWSKA u. WOJTON (1975) drehten mageres Schweinefleisch im Fleischwolf durch und beimpften das Substrat mit einer 24 Stunden alten Keimsuspension, in der 10 verschiedene Salmonella-Species enthalten waren. 20 - g - Proben wurden in Pergamentpapier oder Polyäthylenfolie verpackt und bei - 18 °C eingefroren. Eine sechsmonatige Gefrierlagerung bei dieser Temperatur überdauerten 90 % der Stämme. Nur S. t h o m p s o n konnte bereits nach 3 Monaten nicht mehr rekultiviert werden. Jedoch war bei dieser Species die Ausgangskeimzahl in der Mischsuspension gegenüber den anderen erniedrigt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, aus denen hervorging, daß die 10 untersuchten Salmonella - Species unterschiedliche Gefrierresistenzen aufwiesen, sind in Tabelle 4 dargestellt.

3. Untere Wachstumsgrenztemperaturen für Salmonellen

Die Unterbindung der Vermehrung von Salmonellen in Lebensmitteln ist zur Vermeidung von Lebensmittelvergiftungen von größter Bedeutung (PETZOLD u. SCHEIBNER, 1965). Zur Erfassung der unteren Wachstumsgrenztemperatur dieser Keimgruppe wurden zahlreiche Versuche unternommen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 4

Keimzahlreduktion durch Gefrieren und Gefrierlagerung bei -18 °C von 10 Salmonella-Arten in Schweinehackfleisch (auf BP-Agar). — Alter der eingemischten Keimsuspension 24 Stunden, Konzentration im Substrat 2,5 · 10^3 / g (nach A. Kossakowska und B. Wojton, 1975)



1 = Salmonella anatum
2 = Salm. choleraesuis 677
3 = Salm. choleraesuis 78
4 = Salmonella london
5 = Salmonella derby
6 = Salmonella typhimurium
7 = Salmonella enteritidis
8 = Salmonella brandenburg
9 = Salmonella senftenberg
10 = Salmonella thompson •

* = Ausgangskonzentration im Substrat von nur 1,5 · 10^3 / g

Tabelle 5

Untere Grenztemperatur für die Vermehrung von Salmonellen

Autor und Erscheinungsjahr	Substrat	untersuchte Spezies	untere Vermehrungstemperatur (+°C)
Prescott und Greer 36	diverse Lebensmittel	9	3,9
Stokes und Osborne 56 Johne 61	diverse Nährmedien	oranienburg typhimurium abortusequi	5,0
Angelotti et al. 61 Ray et al. 72	diverse Lebensmittel	senftenberg manhattan enteritidis	5,6
Sulzbacher 52	Hackfleisch	anatum choleraesuis	7,0
Matches und Liston 68 Yuzaburo 71	Agaroberfläche	diverse	< 5,5
Petzold und Scheibner 65	diverse Nährmedien	40	5,0 ± 0,5
Schittenhelm 64	Fleischbrühe, Karottensaft u.a.	typhimurium	7,0
Alford und Palumbo 69	Hackfleisch	23	4,0

C. Eigene Untersuchungen

I. Material

1. Versuchsstämme

Die Untersuchungen umfaßten die nachstehend angegebenen Stämme von S. enteritidis (Kontrollstamm, 786 / 73, 2823 / 73, 445 / 73, 1406 / 74) und S. typhimurium (318 / 67, 56 / 73, 445 / 73, 7 / 74, 16 / 74). Alle Stämme waren von Prof. Dr. Pietzsch aus dem Robert von Ostertag - Institut des Bundesgesundheitsamtes in Berlin überlassen worden.

2. Prüfsubstrate

Das Versuchsfleisch war mageres, von groben Sehnen und Fett befreites Rindfleisch aus der Keule des Hintervierteils, bzw. mageres schwartenfreies Schweinefleisch aus dem Schinken. Das Untersuchungsmaterial stammte von 2 - 3 Tage alten tauglichen Schweine- bzw. von bis zu 6 Tage alten Rindertierkörpern aus Normalschlachtungen des Schlachthofes Berlin - Spandau.

Für die Überprüfung in Milch wurde teilentrahmte, ultrahocherhitzte Milch (1.5 % Fett, 3.3 % Milcheiweiß, 4.5 % Milchzucker) der Firma Mibena verwendet.

Zur Untersuchung des Verhaltens der Salmonellen in flüssigen Nährmedien diente Standard - II - Nährbouillon (Merck, Art.-Nr. 7884), die mit o.5 % Fleischextrakt (Merck, Art.-Nr. 3979) angereichert wurde.

3. Material zur Überprüfung des Ausgangssubstrates

Der biologische Test auf bakterielle Hemmstoffe wurde auf Hemmstoffplatten mit Bac. subtilis BGA, pH 6.o und pH 8.o, durchgeführt. Als Kontrollplättchen wurden Penicillin G o.o1 und Streptomycin o.5 g (Oxoid,

Chargen 3520 und 3521) verwendet. pH-Werte wurden elektrometrisch mit einem Gerät der Firma Knick (Typ pH 27) gemessen. Das auspreßbare Wasser der Versuchsfleischchargen wurde mit einem Kompressorium in Form des 'Braunschweiger Gerätes' nach ROEMMELE et al. (1961) der Firma Chiron, Tuttlingen, bestimmt, wobei Fließpapier der Firma Schleicher & Schüll, Art. Nr. 1117, benutzt wurde.

4. Material für die Aufbereitung der Substrate

Zur oberflächlichen Dekontamination des Versuchsfleisches wurde eine Jet-Gaz-Lötlampe (Sidemat, Modell Butan 370) verwandt. Die Zerkleinerung des Versuchsgutes sowie die Durchmischung mit der Keimsuspension wurde in zwei Versuchskuttern der Firma E. Müller & Söhne (Typ 11/T 2), deren Schüsseln etwa 10 Liter Fassungsvermögen hatten, vorgenommen. Die Verpackung der Versuchsproben erfolgte in 20 x 20 cm großen, o.o5 mm dicken sterilen Aluminiumfolienstücken. Das Abwiegen geschah mit einer elektrischen Präzisionswaage der Firma Mettler (Typ E 2000). Die Abfüllung der beimpften Milch- und Bouillonproben in Rundbodengläser (160 x 16) wurde mit einer stufenlos von 1-10 ml regelbaren Pipettierspritze der Firma Ultra-asept durchgeführt.

5. Gefrier- und Registriereinrichtungen

Für das Einfrieren sowohl der Milch und Bouillon als auch der Fleischproben wurden einerseits mit Regelthermostaten (Firma Danfos) und Ventilatoren versehene Haushaltsgefriertruhen der Firma Linde (Typ Polaris 27), andererseits eine mit starker Luftumwälzung ausgestattete Temperaturprüftruhe der Firma Vötsch (Typ VLM 04/300) verwendet. Bei den Polaris-Truhen der Firma Linde kam es aufgrund der Arbeitsweise der Kühlmaschinen in regelmäßigen Abständen zu Temperaturschwankungen um ca. 2 °C, die jedoch

erst nach Erreichung der gewünschten Gefriertemperatur in Form einer Temperaturerniedrigung auftraten. Bei der speziell für exakte Temperaturführungen hergestellten Vötsch-Truhe wurden Abweichungen nicht ermittelt.

Registrierungen des Einfrierverlaufes wurden mit einem transportablen Sechspunktschreiber (Firma Steinig, Berlin) sowie dem im Vötsch-Gerät festinstallierten Schreiber der Firma Jumo durchgeführt, wobei Einstichwiderstandsthermometer des Typs PT 100 (Firma Haase, Berlin) mit einem Durchmesser von 2.4 mm benutzt wurden. Die Meßzone befand sich in der Spitze des Thermometers und hatte eine Länge von ca. 15 mm. Die Punktfolge der einzelnen Messungen betrug 20 Sekunden. Für einige zusätzliche Rand-Kernmessungen im Fleisch wurden empfindliche Mikrothermoelemente aus Eisen-Konstantan mit einem Durchmesser von o.5 mm und einer Meßlänge von etwa 1 mm +) verwendet. Diese Messungen wurden mit einem Kompensationsschreiber (Firma Hewlett & Packard, Typ 7100 BM) registriert.

6. Material zur Aufbereitung der Proben für den kulturellen Nachweis

Die Fleischproben wurden in 250 ml fassenden, vorher und nachher mit Aluminiumfolien abgedeckten sterilisierten Zentrifugengläsern, die Milchproben in 50 ml-Reagenzröhrchen homogenisiert. Dazu wurden der Ultra-Turrax und die Ultra-Turrax-Stäbe, Typ 18 K (Firma Jahnke & Kunkel) verwendet. Milch und Bouillonproben wurden im Wasserbad (Firma Köttermann, Typ3043) angetaut.

Für den Homogenisiervorgang und das Anlegen der Verdünnungsreihen wurde die sogenannte Drop-Lösung (o.75 g Agar, 8.5 g NaCl, 1.o g Pepton aus Casein, aqua demin. ad 1000 ml) benutzt.

+) Laborausführung der Fachrichtung Elektronenmikroskopie

7. Prüfmedien zur Identifizierung und Kultivierung

Die serologische Überprüfung der Versuchsstämme wurde mit absorbierten Salmonella - Faktorenseren der Firma Behring durchgeführt. Die für die biochemische Überprüfung in der 'Bunten Reihe' erforderlichen Prüfsubstrate wurden im Institut nach bekannten Vorschriften hergestellt. Die Kulturenvermehrung wurde in Standard - II - Nährbouillon zuzügl. o.5 % Fleischextrakt (Merck, Art.-Nr. 7884 bzw. 3979) vorgenommen. Bei der Salmonellen - Anreicherung gelangte die Tetrathionat - Brühe nach Müller - Kauffmann (Oxoid, Art.-Nr. CM 343) zur Anwendung. Als feste Medien zur Rekultivierung der Keime aus ungefrorenen oder gefrorenen Substraten wurden neben dem Standard - II - Nähragar (Merck, Art.-Nr. 7833) mit Zusatz von o.5 % Fleischextrakt der Lackmus - Laktose - Agar mit Kristallviolett nach Drigalski - Conradi (Merck, Art.-Nr. 5317) sowie der Hektoen - Enteric - Agar (Oxoid, Art.-Nr. CM 418) verwendet.

II. Methodik

1. Überprüfung des Status der Versuchssubstrate

a) Fleisch

In der Versuchsserie I wurde bei den Versuchen 1 und 7 mit Rindfleisch, bei den Versuchen 2 - 6 mit Schweinefleisch gearbeitet. Alle Ansätze der Versuchsserie II (Versuche 8 - 20) wurden parallel mit Rind- und Schweinefleisch durchgeführt.

Zur Überprüfung der Versuchsfleischchargen wurde neben dem nach bekannter Vorschrift in den Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz durchgeführten biologischen Test auf bakterielle Hemmstoffe ein Nachweis-

versuch für bereits intravital oder postmortal in das Versuchsgut gelangte Salmonellen sowie eine Messung des Anteiles des auspreßbaren Wassers vorgenommen.

Für die Anreicherung auf Salmonellen aus dem Ausgangsmaterial wurden 2 - 3 g Material von der Oberfläche und aus der Tiefe der noch nicht abgeflammten Muskulatur entnommen und in 50 ml Müller - Kauffmann - Bouillon für 24 Stunden bei 40 °C bebrütet. Anschließend wurden je o.1 ml auf Hektoen - Enteric - Agar ausgestrichen. Zur Überprüfung des Grades der Wässrigkeit an Hand des auspreßbaren Wassers wurden etwa 100 - 200 mg bindegewebs-, fett- und blutfreies Muskelfleisch für ca. 90 Sekunden gepreßt. Die mittlere Breite der Durchfeuchtungszone, die sich um die Probe herum ausbildete, wurde registriert.

b) Milch und Bouillon

Sowohl die ultrahocherhitzte, teilentrahmte Milch als auch die sterilisierte Standard - II - Nährbouillon waren keimfrei, in ihrer Zusammensetzung bekannt und daher keiner weiteren Prüfung zu unterziehen.

2. Überprüfung der Teststämme

Die serologische Überprüfung der in wöchentlichen Abständen auf Standard - II - Nähragar überimpften Versuchsstämme erfolgte mit der Objektträgeragglutination. Die biochemische und physiologische Kontrolle wurde nach den in Tabelle 6 dargestellten Merkmalen vorgenommen.

3. Aufbereitung der Prüfsubstrate für den Einmischvorgang

Von dem bereits auf dem Schlachthof von groben Sehnen, Fett und Schwarten befreiten Versuchsfleisch wur-

Tabelle 6

Biochemische und physiologische Charakteristika der untersuchten Salmonella-Stämme	Salm. enteritidis (BGA-Kontrollstamm) Instituts-signatur = E 33	Salm. typhimurium (BGA 318/67) Instituts-signatur = E 34
Laktose-Abbau	–	–
Lysindecarboxylase	+	+
Indol-Bildung	–	–
Voges-Proskauer-Reaktion	–	–
Citrat-Abbau	+	+
Urease	–	–
Beweglichkeit	+	+
H_2S-Bildung	+	+
Gelatine-Verflüssigung	–	–
Dulcit-Abbau	+	+

+ = positiv – = negativ

den äußerlich sichtbare Fett-, Sehnen- und Faszienreste entfernt. Anschließend wurde die durch das Hantieren mit dem Fleisch entstandene Oberflächenkontamination mithilfe einer Lötlampe weitgehend beseitigt, um eine möglichst niedrige Gesamtkeimzahl des Fleisches zu erhalten. Da sich das Versuchsfleisch bei dieser Prozedur ziemlich erwärmte, wurde es anschließend in zwei, vorher im Dampftopf sterilisierte Plastikeimer verbracht. Nach Abdeckung der Eimer mit Aluminiumfolie wurde das Fleisch bei - 6 °C bis zum Erreichen einer Kerntemperatur von + 2 °C gelagert. Dieser Vorgang dauerte je nach Größe der Fleischstücke zwischen 2 und 4 Stunden und diente dem Zweck, eine während des weiteren Versuchsablaufes auftretende Erwärmung des Versuchsgutes auf mehr als 10 °C zu verhindern. Bei Temperaturen über 10 °C hätte der spätere Einfriervorgang, insbesondere bei - 6 °C, eines ziemlich langen Zeitraumes bedurft, wobei die unterste Vermehrungsgrenze der Salmonellen von etwa 4 °C erst nach wenigstens einer Stunde erreicht worden wäre. Eine auch nur geringe Erhöhung der Keimzahl während der Einfrierzeit hätte die nach dem Gefrieren erhaltenen Werte verfälscht, welche in Relation zu den vor dem Einfrieren im Substrat ermittelten Keimmengen gesetzt wurden. Nach Herabkühlen des Fleisches auf 2 °C wurde die erste Charge des Fleisches (Rind oder Schwein) unter möglichst sterilen Bedingungen in etwa doppeltfaustgroße Stücke geschnitten und in einem der beiden Versuchskutter gleichmäßig verteilt. Die Kutterschüsseln waren am Tage zuvor sorgfältig abgeflammt und anschließend mit sterilisierter Aluminiumfolie abgedeckt worden. Anschließend wurde das Versuchsfleisch 15 Sekunden auf Stufe 2 durchgekuttert, bis eine leicht formbare Masse entstanden war. Aus dieser wurden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl des Fleisches nach dem Kuttern 5 Proben à 10 g entnommen und in die für den Homogenisiervorgang bereitstehenden Zentrifugengläser abgefüllt. Gleichzeitig wurden die zur Durchführung der Temperaturmessungen während der Einfrier- und Gefrierlagerzeit erforderlichen 100 g - Päckchen in Aluminiumfolie verpackt. Da bei diesen

Kontrollen aufgrund des geringen Volumens eine Temperaturerhöhung wesentlich schneller vor sich ging als beim Rest des noch im Kutter befindlichen Fleisches, wurden sie im Kühlschrank bei etwa 8 °C bis zum Einbringen in die Gefriertruhen gelagert. So war gewährleistet, daß alle Proben zum Zeitpunkt des Einfrierens in etwa die gleiche Temperatur hatten, wobei allerdings Schwankungen von 2 - 3 °C nicht ausgeschlossen werden konnten.

4. Beimpfung der Substrate

a) Fleisch

In der Serie I (Versuche 1 - 7) wurden parallel 18 Stunden alte Kulturen von S. enteritidis (BGA Kontrollstamm) und S. typhimurium (BGA 318 / 67) eingemischt. Die Fleischversuche der Serie II (Versuche 8 - 20) wurden ausschließlich mit S. typhimurium (BGA 318 / 67) durchgeführt, wobei in den Ansätzen 8 - 17 vier Stunden alte und in den Ansätzen 18 - 20 achtzehn Stunden alte Kulturen verwendet wurden.

Das mit einem sterilen Hartplastikspachtel gleichmäßig in der Kutterschüssel verteilte Hackfleisch wurde ringsum mit einer etwa 3 cm breiten und 2 cm tiefen Rinne versehen. In diese wurden die für 4 oder 18 Stunden bei 37 °C bebrüteten Salmonella - Keimsuspensionen eingeträufelt. Diese Suspensionen enthielten zwischen 10^7 und 10^8 Keime / ml. Die Einmischdosis wurde jeweils so gewählt, daß die Keimkonzentrationen im zerkleinerten Substrat zwischen 10^5 und 10^6 Keime / g lagen (d.h. 10 ml auf 1 kg). Um eine möglichst homogene Verteilung der Salmonellen im Versuchsfleisch zu erhalten, wurde es abermals 15 Sekunden bei Stufe 2 gekuttert. Sofort nach Beendigung des Einmischvorganges wurden analog zu den unbeimpften Kontrollen 100 g - Portionen in sterile Aluminiumfolie verpackt. Um einen möglichst gleichartigen Einfrierprozeß zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, daß alle Päckchen gleiche

Stärken und Durchmesser aufwiesen. Anschließend wurden zusammengehörige Proben in Polyäthylenbeutel verpackt, mit unbeimpften Kontrollen versehen und in die einzelnen Truhen eingelagert.

b) Milch und Bouillonversuche

In Milch und Bouillon wurden alle unter Punkt 1 des Abschnittes Material beschriebenen Salmonella - Stämme eingemischt. Sie waren in Standard - II - Nährbouillon für 18 Stunden bei 37 °C angezüchtet worden. Nach zweifachem Zentrifugieren und Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde mithilfe eines frisch angesetzten $BaSO_4$-Standards eine auf 10^7 Keime / ml eingestellte Salmonellasuspension hergestellt. Diese wurde im Verhältnis 1 : 10 in teilentrahmte Milch oder Standard - II - Nährbouillon eingemischt. Die beimpften Proben wurden anschließend zu je 5 ml mit Pipettierspritzen in Rundbodengläser abgefüllt. Die Röhrchen wurden mit Kapsenbergverschlüssen versehen, in Reagenzröhrchenständer gestellt und eingefroren.

5. Einfrieren und Temperaturregistrierung

a) Fleischversuche

Eine Übersicht über die in den einzelnen Versuchen angewendeten Temperaturen ist aus Tabelle 7 ersichtlich. Bei von der Einfriertemperatur abweichenden Gefrierlagertemperaturen (z.B. - 20 °C / - 12 °C) bedeutet die zweite Zahl die Gefrierlagertemperatur. Die Proben wurden am Boden der Truhen in gleichem Abstand vom Ventilator gelagert, wobei darauf geachtet wurde, daß sie in den Polyäthylenbeuteln nicht übereinander lagen. Die Temperaturmessungen erfolgten im Kern der unbeimpften Kontrollen. Bei einem Versuchsansatz (Versuch 13, Temperatur - 20 °C)

Tabelle 7

Verwendete Kombinationen (+) von Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (°C) in den Versuchsserien I und II

Serie	Versuch Nr.	-6 / -6	-12/-12	-20/-20	-40/-40	-20/-12	-40/-12	-40/-20
I	1			+			+	+
	2			+		+	+	+
	3	+						
	4		+					
	5			+				
	6				+			
	7	+	+	+			+	+
II	8 – 20	+	+	+				

wurden zusätzlich Mikrothermoelemente in Rand- und Kernzone der unbeimpften Kontrolle angebracht, um Unterschiede im Einfrierverlauf deutlich zu machen.

b) Milch- und Bouillonversuche

Die Milch- und Bouillonversuche wurden bei den Temperaturmodifikationen - 20 °C /- 20 °C; - 40 °C /- 40 °C; - 20 °C /- 12 °C; - 40 °C /- 12 °C und - 40 °C /- 20 °C durchgeführt. Die Probenröhrchen, bei denen eine von der Einfriertemperatur abweichende Lagertemperatur angewendet wurde, wurden nach 18 Stunden in die entsprechenden Truhen umgelagert. Da diese Versuche nur orientierenden Charakter hatten und der Auswahl der Fleischteststämme dienten, war auf eine Registrierung des Einfrierverlaufes verzichtet worden.

6. Aufbereitung der Proben für den kulturellen Nachweis

a) Fleischversuche

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl des Fleisches nach dem ersten Kuttervorgang, aber vor dem Beimpfen, wurde bei allen Versuchen durchgeführt. Ebenso wurden bei allen Ansätzen die Ausgangskeimzahlen der im Fleisch nach dem Einmischen vorhandenen Salmonellen ermittelt. Nach dem Einfrieren und während der Gefrierlagerung wurden in den Versuchen 1 - 7 der Serie I sowie allen Versuchen der Serie II (8 - 20) Keimzahlerhebungen nach einem, 10 und 30 Tagen durchgeführt. Bei Versuch 2 der Serie I wurde nach 10 und 90 Tagen untersucht, während bei den Versuchen 3 - 6, außer nach einem und 10 Tagen, nach jedem Monat innerhalb eines halben Jahres der Keimstatus erhoben wurde.

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurden

jeweils 5, für die Salmonellen - Ausgangskeimzahl jeweils 10 - später nur noch jeweils 5 - Parallelproben untersucht. Während der Gefrierlagerzeit wurden für jede Temperaturmodifikation 5 - später, nach vollständiger Einarbeitung in die Methodik, nur noch 3 - Parallelproben zur Bestimmung der Keimzahl herangezogen. Bei der Ermittlung der Gesamtkeimzahlen sowie der Ausgangskeimzahlen wurden jeweils 10 g - Proben aus verschiedenen Stellen des Versuchsgutes zusammengestellt, in Zentrifugengläser abgefüllt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und bis zur Beendigung des Abpackvorganges im Kühlschrank aufbewahrt. Die Proben wurden etwa 15 Minuten später, nachdem das gesamte Versuchsgut in die Truhen eingelagert war, aufgearbeitet.

Aus den gefrorenen 100 g - Päckchen wurden ebenfalls je 10 g mithilfe eines stabilen Messers und einer Gabel, die zwischendurch regelmäßig abgeflammt wurden, herausgestanzt. Diese Fleischstückchen mit einer Kantenlänge von etwa 2 cm bestanden sowohl aus oberflächlichen Teilen als auch aus Material aus der Tiefe der Probe. Auf die Anwendung eines langsamen Auftauvorganges wurde bis auf den Vorversuch 1 verzichtet, da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Einflüsse des Gefrierens und der Gefrierlagerung untersucht werden sollten. Die Proben wurden lediglich für etwa 3 Minuten in der Verdünnungsflüssigkeit gelassen, ehe mit dem Homogenisieren begonnen wurde. Auf die 10 g - Proben wurden 90 ml Drop - Lösung gegeben, und anschließend wurde etwa 40 Sekunden bei 20.ooo U / Min. homogenisiert. Es wurde darauf geachtet, daß sich das Homogenisat nicht über 5 - 6 °C erwärmte. Im Vorversuch 1 (Serie I) wurde nach 6 Stunden eine weitere Keimzahlbestimmung gemacht. Bis zum Anlegen dieser Verdünnungsreihe wurde das Homogenisat bei Zimmertemperatur stehengelassen. Zwischen den einzelnen Homogenisiervorgängen wurden die Ultra - Turrax - Stäbe in gekühltem demineralisierten Wasser gereinigt.

b) Milch- und Bouillonversuche

Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl vor dem Gefrieren wurden bei den Milch- und Bouillonversuchen 5, während der Gefrierlagerung bis zum 180. Tag jeweils 3 Parallelproben untersucht. Vor dem Gefrieren bedurfte es keiner weiteren Aufbereitung der Proben zur Keimzahlerhebung, da aus den Röhrchen eine Verdünnungsreihe direkt angelegt werden konnte. Die gefrorenen Proben wurden im Wasserbad bei 30 °C für etwa 90 Sekunden aufgetaut, so daß noch ein gefrorener Kern im Zentrum der Proben sichtbar war. Die Bouillonröhrchen wurden anschließend so lange mit dem Whirl - Mix gemischt, bis sich das Eis gänzlich aufgelöst hatte. Nachdem bemerkt wurde, daß bei der angetauten Milch auch nach längerer Durchmischung mit dem Whirl - Mix keine bessere Homogenität zu erreichen war, wurden die Proben in 50 ml - Reagenzröhrchen umgeschüttet und dann 10 Sekunden bei 20.000 U / Min. homogenisiert.

7. Kultureller Nachweis und Identifizierung

Sowohl aus dem Homogenisat der Fleischproben als auch aus den Milch- und Bouillonröhrchen wurden Verdünnungsreihen in Zehnerstufen angelegt. Dazu wurden jeweils 0.5 ml des zu untersuchenden Substrates auf 4.5 ml Drop - Verdünnungslösung gegeben und mit dem Whirl - Mix etwa 6 Sekunden vermischt. Aus den geeigneten Verdünnungsstufen, die nach der zu erwartenden Keimzahl bestimmt wurden, wurden 0.1 ml mit der Pipette auf feste Nährböden ausgestrichen. Die Gesamtkeimzahlbestimmung des Fleisches wurde ausschließlich auf Standard - II - Nähragar durchgeführt. Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl vor dem Gefrieren sowie zur Reisolierung aus den gefrorenen Substraten wurde zusätzlich der Drigalski - Agar mit Kristallviolett verwendet; allerdings wurde bei den Ansätzen 18

bis 20 auf diesen Nährboden verzichtet. Zur Keimzahlbestimmung bei den Milch- und Bouillonproben wurde nur der Standard - II - Nähragar verwendet.

Bei der gleichzeitigen Benutzung zweier Nährböden erfolgte die Aussaat in jedem Falle aus der gleichen Verdünnungsreihe, wobei auch nur einmal mit der Pipette aufgesogen wurde.

Nach einer Bebrütungsdauer von 20 Stunden bei 37 °C wurden Platten mit 30 - 300 Keimen ausgezählt. Dies bereitete keine Schwierigkeiten, da die Konzentration der eingeimpften Salmonellen im Fleisch sowohl vor als auch nach dem Gefrieren so hoch war, daß die Kontaminationsflora in den entsprechenden Verdünnungsstufen nicht mehr auf den beimpften Platten erscheinen konnte. Dadurch lagen die Salmonellen nicht nur bei den Milch- und Bouillon - Versuchen sondern auch bei den Fleischversuchen auf den Platten in Reinkultur vor. Vereinzelt auftretende fragliche Kolonien, die auf eine Kontamination der Platten zurückzuführen waren, wurden mithilfe polyvalenter Salmonella - Faktorenseren eliminiert.

III. Ergebnisse

1. Beschaffenheit des Substrates Fleisch

a) Versuchsserie I

Eine Übersicht über die Beschaffenheit des Substrates gibt die Tabelle 8. In der Versuchsserie I (Versuche 1 - 7) wurden zwei Versuche mit ca. 4 - 6 Tage altem Rindfleisch und fünf Versuche mit ca. 2 - 3 Tage altem Schweinefleisch durchgeführt. Der pH - Wert des Rindfleisches bewegte sich nach 24 - 48 Stunden zwischen 5.8 und 5.9, der des Schweinefleisches durchgehend 6.2. Erhöhte Wäßrigkeit (d.h. mehr als 2 mm Durchfeuchtungszone) konnte nur bei Versuch 5 (Schweinefleisch) festgestellt werden. Die Gesamtkeimzahl - jeweils als Median aus 5 Parallelproben - des Rindfleisches nach dem ersten Kuttervorgang, aber vor dem Beimpfen mit Salmonellen, lag zwischen 9×10^2 (Versuch 7) und 7.6×10^4 (Versuch 1) Keimen pro Gramm. Im Schweinefleisch waren zwischen 2×10^2 (Versuch 4) und 8.2×10^3 (Versuch 5) Keime pro Gramm anzutreffen.

b) Versuchsserie II

In der Serie II wurden 13 Versuche parallel mit Rind- und Schweinefleisch durchgeführt. Im Substrat Rindfleisch waren die niedrigsten pH - Werte (5.6) bei den Versuchen 14, 15 und 17 zu beobachten. Das pH - Maximum wurde in Versuch 8 mit 6.2 gemessen. Eine erhöhte Wäßrigkeit trat in den Versuchen 17 und 19 auf. Die Gesamtkeimzahl vor dem Beimpfen war mit 1×10^4 Keimen / g in Versuch 13 am höchsten und mit 7×10^2 Keimen / g bei den Versuchen 9, 15 und 16 am niedrigsten. Im Mittel (Median der Mediane) wurden 2×10^3 Keime / g ermittelt.

Im Schweinefleisch wurde der niedrigste pH - Wert (5.8) in den Versuchen 11 und 13 gemessen, während die übrigen Werte im Bereich von 5.9 - 6.2 lagen. Eine

Tabelle 8

Status des Versuchsfleisches zur Zeit der Verarbeitung

Versuchsserie I		pH-Wert	Auspreß-bares Wasser*	Gesamtkeimzahl/g vor dem Beimpfen**	
Vers. Nr.	Substrat	24 - 48 h		Kutter I	Kutter II
1	Rind	5,8	–	76 000	12 000
2	Schwein	6,2	–	400	100
3	Schwein	6,2	–	2 900	2 700
4	Schwein	6,2	–	1 600	200
5	Schwein	6,2	+	900	8 200
6	Schwein	6,2	–	800	5 000
7	Rind	5,9	–	1 300	900

Versuchsserie II	Substrat Rind			Substrat Schwein		
Vers. Nr.	pH-Wert 24-48h	Auspreß-bares Wasser*	Gesamtkeimzahl/g vor dem Beimpfen**	pH-Wert	Auspreß-bares Wasser*	Gesamtkeimzahl/g vor dem Beimpfen**
8	6,2	–	4 700	6,2	–	3 600
9	6,0	–	700	6,2	+	1 100
10	6,0	–	3 900	6,2	–	4 400
11	5,9	–	1 400	6,2	–	900
12	5,6	–	800	6,1	–	20 000
13	5,8	–	10 000	6,0	+	2 800
14	5,6	–	5 400	6,1	–	2 300
15	5,6	–	700	6,2	–	1 800
16	5,9	–	700	6,0	–	1 100
17	5,6	+	2 100	5,9	–	2 500
18	5,9	–	1 400	5,8	–	900
19	5,9	+	2 000	6,1	–	1 800
20	5,9	–	7 000	5,8	–	8 000

* = Kompressoriums-Methode: + = >2 mm und – = <2 mm

** = Median aus 5 Parallelbestimmungen auf Standard-II-Nähragar

Salmonellenanreicherung und Hemmstofftest verliefen bei allen Versuchen negativ

erhöhte Wäßrigkeit des Versuchsfleisches konnte in den Versuchen 2 und 6 ermittelt werden. Die Gesamtkeimzahl erreichte mit 2×10^4 Keimen / g in Versuch 12 ihr Maximum und war bei den Versuchen 11 und 18 mit 9×10^2 / g am niedrigsten. Im Mittel (= Median der Mediane) wurde eine Keimzahl von 2.3×10^3 Keimen / g festgestellt.

2. Beschaffenheit der Versuchsstämme

Die regelmäßige biochemische und physiologische Überprüfung der Fleischversuchsstämme nach den in Tabelle 6 (Seite 47) aufgeführten Merkmalen ergab in keinem Falle einen Hinweis auf Veränderungen der Stämme, die aus den gefrorenen Substraten reisoliert wurden. Die serologische Überprüfung brachte in einigen Fällen (Versuche 16 und 18) negative Befunde bei der Agglutination mit H - Faktorenseren. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte jedoch keine Veränderung am Geiselapparat +). In den übrigen Versuchen waren negative Agglutinationsbefunde nicht zu beobachten.

3. Messungen des Einfriervorganges

Aus Tabelle 9 geht die mittlere Dauer der Einfriervorgänge bei - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C hervor, die bei der Versuchsserie II gemessen wurden. Der zeitliche Verlauf des Einfriervorganges bei - 40 °C konnte nur bei zwei Versuchen der Serie I gemessen werden (Tabelle 10), da diese Temperatur bei den nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr angewendet wurde. Gemessen wurde jeweils im Kern der Proben in ca. 18 mm Tiefe. Generelle Unterschiede beim Einfrieren von Rind- und Schweinefleisch konnten

---

+) Für die Anfertigung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme sei der Fachrichtung Elektronenmikroskopie vielmals gedankt.

'Linde - Truhen'

Tabelle 9

Zeitl. Verlauf des Einfriervorgangs in Min. (Mittelwerte der Kerntemp., 10 gleichartiger Versuche)

Substrat	Einfrier-temp. (°C)	Kühlphase 1 zw. Anfangs-temp. und +4°C	Kühlphase 2 zwischen +4°C und ca. -2°C	Gefrierphase 1 zw. ca. -2°C und ca. -4°C	Gefrierphase 2 zw. ca. -4°C und Endtemp.	Einfrierdauer (Summe aller 4 Phasen)
Schwein	- 6	23	170	517	666	1381
	-12	23	142	408	546	1118
	-20	17	61	203	461	747
Rind	- 6	41	136	526	602	1306
	-12	33	110	382	554	1080
	-20	29	72	231	462	794

'Vötsch - Truhe'

Tabelle 10

Zeitlicher Verlauf des Einfriervorgangs in Minuten (Messung d. Kerntemperatur in je einem Versuch)

Substrat	Einfrier-temp. (°C)	Kühlphase 1 zw. Anfangs-temp. und +4°C	Kühlphase 2 zwischen +4°C und ca. -2°C	Gefrierphase 1 zw. ca. -2°C und ca. -4°C	Gefrierphase 2 zw. ca. -4°C und Endtemp.	Einfrierdauer (Summe aller 4 Phasen)
Schwein	-40	20	60	10	90	180
Rind	-40	25	40	10	120	195

nicht festgestellt werden. Auffallend ist jedoch die große Differenz zwischen den Einfriervorgängen bei - 20 °C und bei - 40 °C. Während für das Einfrieren bei - 20 °C in den "Linde - Truhen" etwa 13 Stunden erforderlich waren, benötigte die "Vötsch - Truhe" bis zur Erlangung einer Temperatur von - 40 °C nur ca. 3 Stunden. Bei der Messung des Einfrierverlaufes einer in einer "Linde - Truhe" bei - 20 °C eingelagerten Schweinefleischprobe mithilfe von Mikrothermoelementen wurde festgestellt, daß etwa eine Stunde mehr benötigt wird, um die am Rand der Probe (d.h. in etwa 5 mm Tiefe) registrierte Temperatur auch im Kern der Probe (d.h. in etwa 10 mm Tiefe) zu erreichen. Weiterhin konnte in der Randzone nach 30 - 90 Minuten seit Beginn des Einfrierens ein Temperaturanstieg von - 3 °C auf - 1 °C bemerkt werden. Nach ca. 3 Stunden setzte sich dann die kontinuierliche Temperaturabsenkung fort.

4. Gefrierversuche mit flüssigen und festen Substraten

a) Darstellungsform der Ergebnisse

Für die tabellarische Darstellung der Ergebnisse sowohl der Versuche mit flüssigen Medien als auch der Fleischversuche wurde bis auf die Bouillonversuche, bei denen die Reduktionsraten in Zehnerpotenzen angegeben wurden, eine prozentuale Angabe der Keimzahlen gewählt. Dabei wurden die unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen als 100 % gesetzt und die nach dem Einfrieren bzw. während der Gefrierlagerung ermittelten Werte dazu in Relation gesetzt.

In der Serie I (Versuche 2 - 7) wurden als Einzelwerte zur Darstellung in den Tabellen sowie zu deren Auswertung jeweils der Median aus fünf, bzw. bei der Ermittlung der Ausgangskeimzahl der Median aus 10 Parallelproben herangezogen (Tabellen 11 - 13).

Tabelle 11

Versuch 2

Prozentuale Angabe der Keimzahlen von Salmonella enteritidis (BGA-Kontrollstamm) und von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Schweinehackfleisch bei unterschiedlichen Einfrier- und Gefrierlagertemp. (°C) nach 10 und 90 Tagen (Alter der eingemischten Keimsuspension 18 Stunden. Einzelwert = Median aus 5 sowie bei der Ausgangskeimzahl aus 10 Parallelproben)

→ 100% = Ausgangskeimzahl (AKZ) = 0 Tage Lagerdauer (in Tagen)

0	10	90

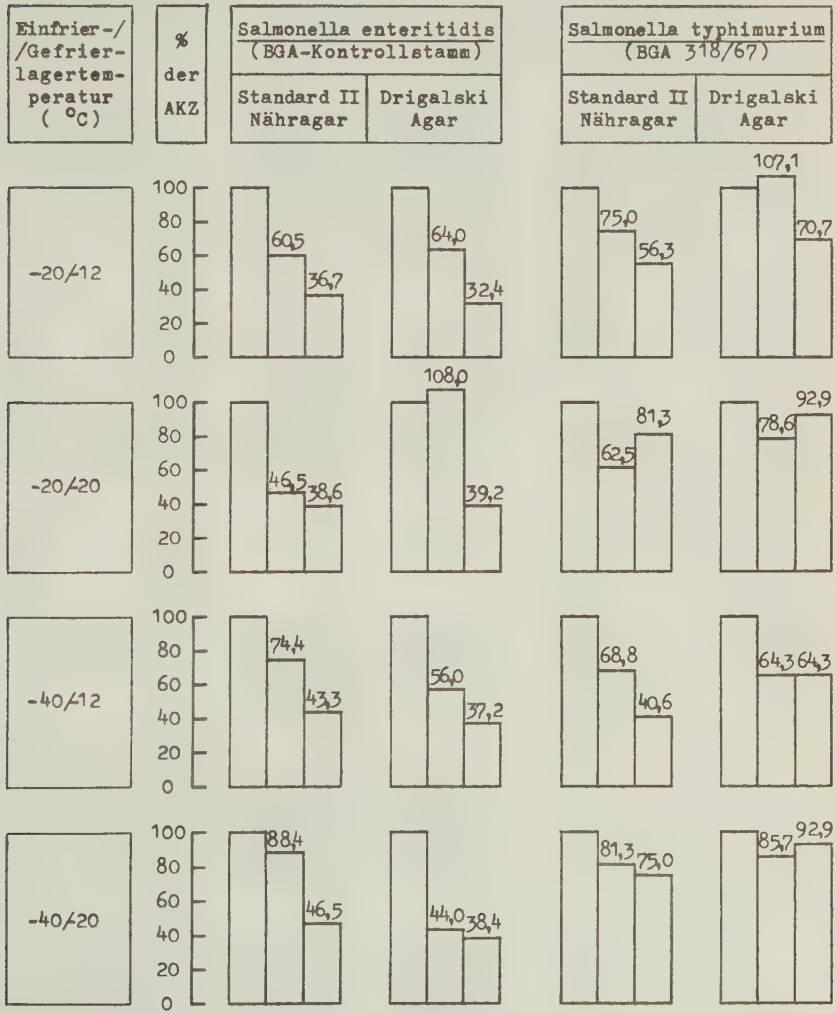


Tabelle 12

Versuche 3 - 6

Prozentuale Angabe der Keimzahlen von Salmonella enteritidis (BGA-Kontrollstamm) und von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Schweinehackfleisch bei unterschiedlichen Einfrier- und Gefrierlagertemp. (°C) nach 1 bis 180 Tagen (Alter der eingemischten Keimsuspension 18 Stunden. Einzelwert = Median aus 5 sowie bei der Ausgangskeimzahl aus 10 Parallelproben)

→ 100 % = Ausgangskeimzahl (AKZ) = 0 Tage

Lagerdauer (in Tagen)

0	1	10	30	60	90	120	150	180

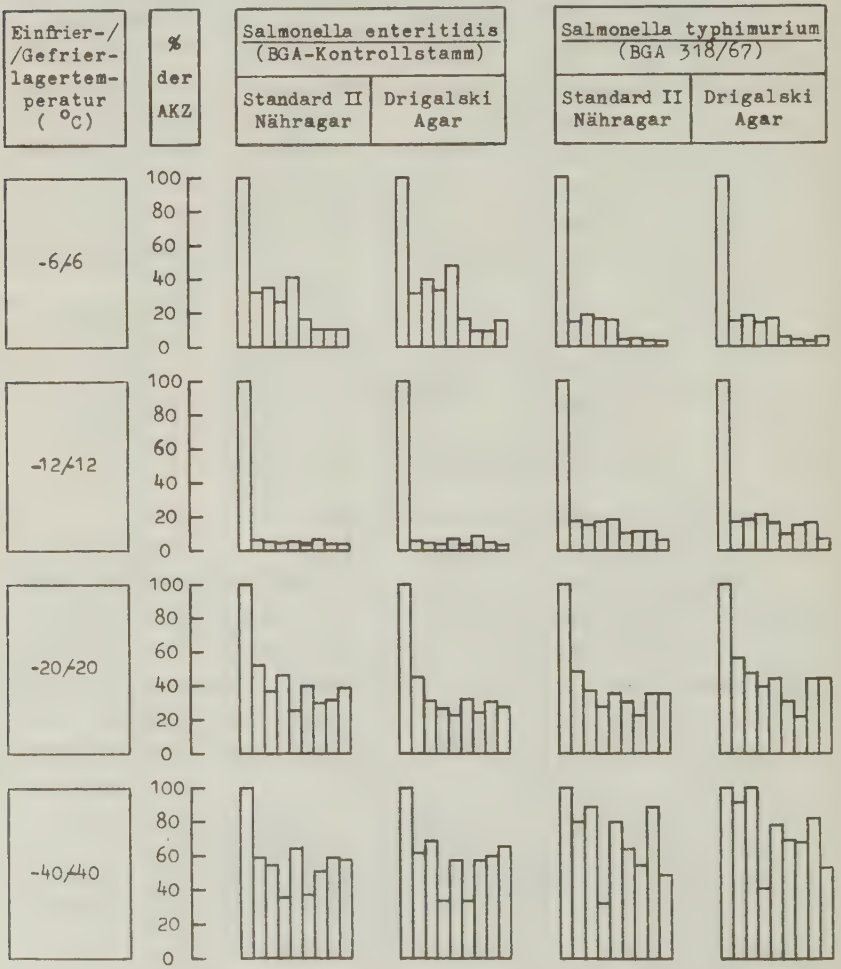


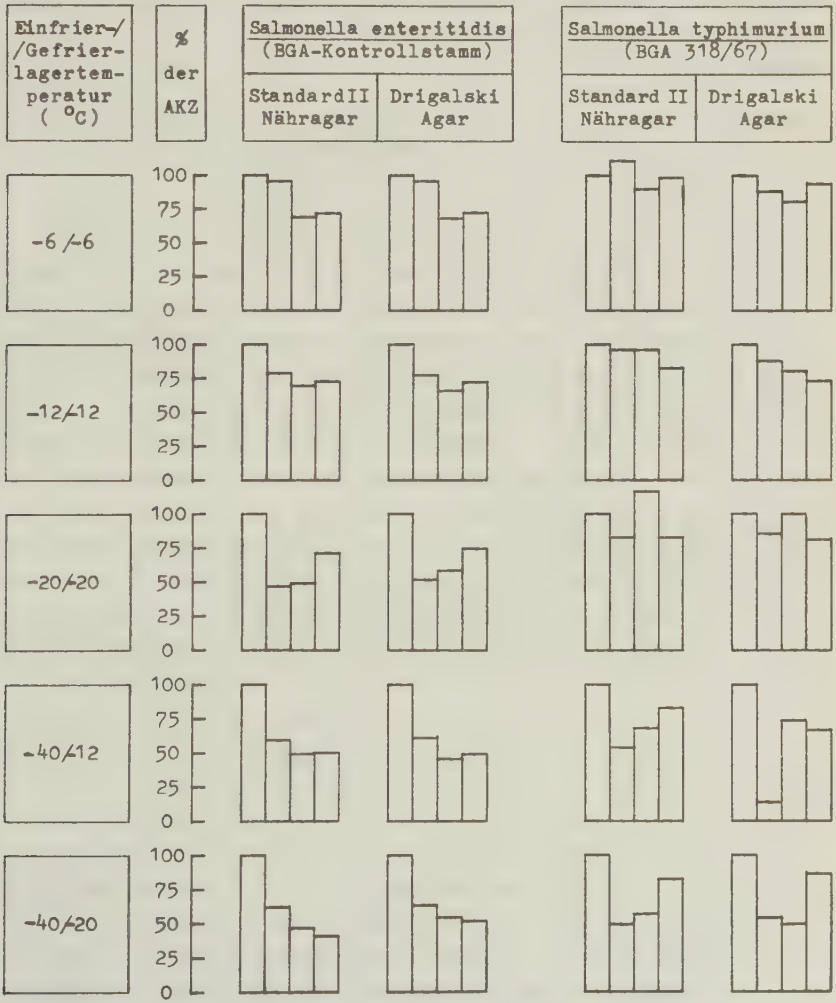
Tabelle 13

Versuch 7

Prozentuale Angabe der Keimzahlen von Salmonella enteritidis (BGA-Kontrollstamm) und von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinderhackfleisch bei unterschiedlichen Einfrier- und Gefrierlagertemp. (°C) nach 1 bis 30 Tagen (Alter der eingemischten Keimsuspension 18 Stunden. Einzelwert = Median aus 5 sowie bei der Ausgangskeimzahl aus 10 Parallelproben)

→ 100 % = Ausgangskeimzahl (AKZ) = 0 Tage

Lagerdauer (in Tagen)			
0	1	10	30



In der varianzanalytisch ausgewerteten Versuchsserie II (Versuche 8 - 20) wurden in den Tabellen 14 und 15 das arithmetische Mittel der durch den Median der Ausgangskeimzahl des jeweiligen Versuches geteilten Einzelkeimzahlen für jeweils eine Temperatur - Zeit - Kombination (z.B. - 6 °C / 1 Tag) für 10 Versuche (Versuche 8 - 17) bzw. für weitere drei Versuche (Versuche 18 - 20) dargestellt.

b) Ergebnisse der Milchversuche

aa) S. enteritidis

Die prozentualen Angaben der Keimzahlen der fünf untersuchten Stämme sind in Tabelle 16 zusammengefaßt. Die Reduktionsraten nach dem Einfrieren betrugen unabhängig von Temperatur und Stamm zwischen 45 und 90 %. In der Folge fielen die Keimzahlen bis zum 180. Tag der Lagerung kontinuierlich ab oder bewegten sich zumindestens auf dem Niveau der nach einem Tag gefundenen Werte. Nach 180 Tagen war keiner der untersuchten S. enteritidis - Stämme vollständig abgestorben. Die unterschiedlichen Temperaturen hatten keinen wesentlichen Einfluß auf das Absterbeverhalten der verschiedenen Salmonella - Stämme. Stammspezifische Unterschiede waren vorhanden, veränderten jedoch nicht die generellen Tendenzen.

bb) S. typhimurium

Auch die fünf untersuchten S. typhimurium - Stämme wichen in ihrem Verhalten gegenüber dem Gefrierprozeß nicht wesentlich voneinander ab. Allerdings schwankte die Keimzahlreduktion nach dem Gefrieren (= 1 - Tage - Wert) zwischen 30 und 90 % im Verhältnis zur Ausgangskeimzahl. Wie auch bei S. enteritidis feststellbar, waren die stärksten Keimabnahmen direkt nach

Tabelle 14

Versuche 8 - 17

Keimzahlangabe in % (arithmetisches Mittel der durch den Median der Ausgangskeimzahlen geteilten Einzelwerte aus 10 Versuchen) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinder- und Schweinehackfleisch bei unterschiedl. Einfrier- und Gefrierlagertemp. nach 1, 10 und 30 Tagen (Alter der eingem. Keimsuspension 4 Stunden)

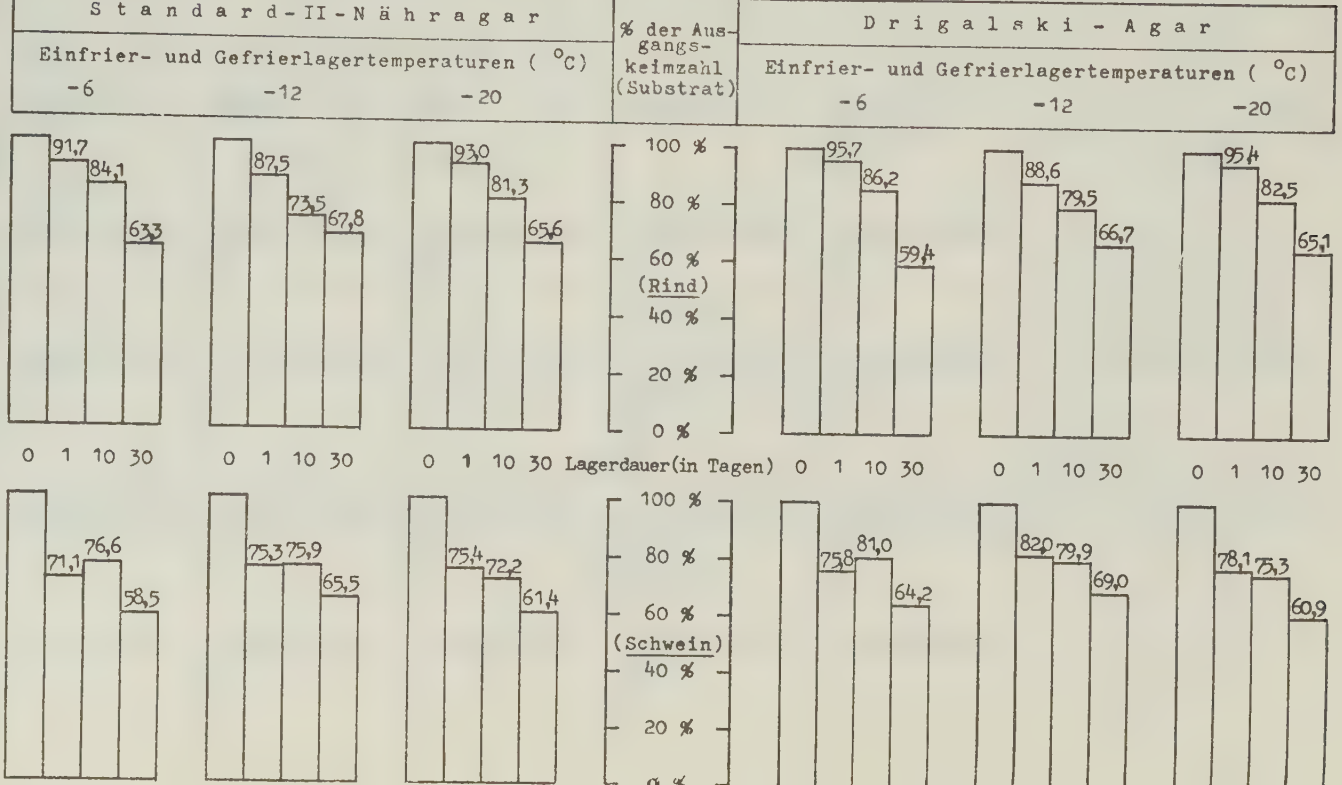


Tabelle 15

Versuche 18-20

Keimzahlangabe in % (arithmetisches Mittel der durch den Median der Ausgangskeimzahlen geteilten Einzelwerte aus 3 Versuchen) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinder- und Schweinehackfleisch bei unterschiedl. Einfrier- und Gefrierlagertemp. nach 1, 10 und 30 Tagen (Alter der eingem. Keimsuspension 18 Stunden)

R i n d			Substrat	S c h w e i n		
S t a n d a r d - II - N ä h r a g a r						
Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (°C)			% der Ausgangskeimzahl	Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (°C)		
-6	-12	-20		-6	-12	-20

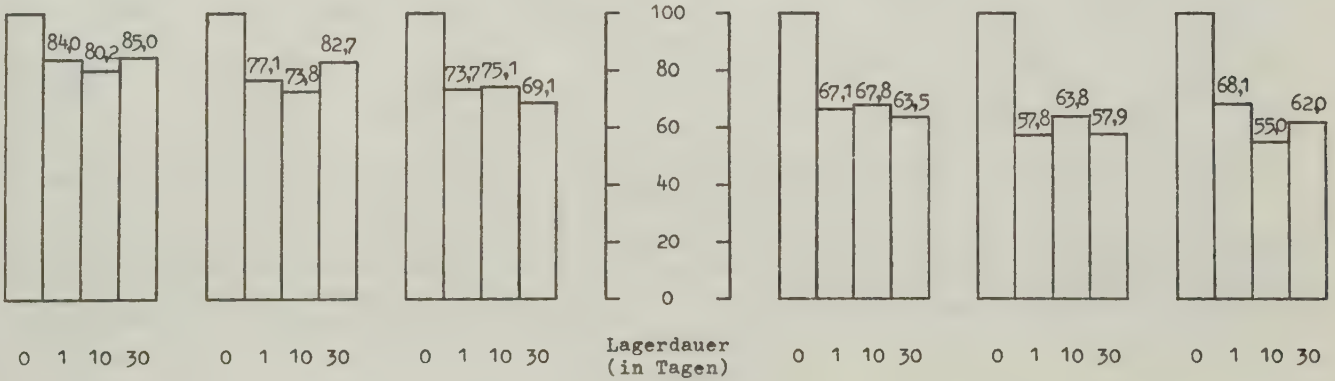


Tabelle 16

Prozentuale Angabe der Keimzahlen von 5 Salmonella-enteritidis-Stämmen in teilentrahmter Milch (1,5% Fett) bei unterschiedlichen Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (°C) nach 1 bis 180 Tagen (Einzelwert = Median aus 3 Parallelproben)

→100 % = Ausgangskeimzahl (AKZ) = 0 Tage Lagerdauer (in Tagen)

0	1	10	30	60	90	120	150	180

Einfrier-/Lagertemp.(°C)	% der AKZ	Kontrollstamm	Salmonella enteritidis (BGA) 2823/73	1406/74	786/73	445/73
-20/20	100 80 60 40 20 0					
-40/40	100 80 60 40 20 0					
-20/12	100 80 60 40 20 0					
-40/12	100 80 60 40 20 0					
-40/20	100 80 60 40 20 0					

dem Einfrierprozeß zu bemerken, während das Keimniveau im Verlauf der Gefrierlagerung nur noch langsam zurückging oder aber gleichblieb. Aus Tabelle 17 geht hervor, daß bisweilen dem "normalen" Einfrierverlauf widersprechende Werte auftraten. Dabei kam es z.B. bei S. typhimurium 5/74 bei den Temperaturmodifikationen -40 °C / -20 °C und -40 °C / -40 °C nach 60 bzw. 180 Tagen zu erhöhten Reisolierungsraten, die dem vorher ermittelten Keimniveau nicht entsprachen. Alle S. typhimurium-Stämme waren nach sechs Monaten Gefrierlagerung noch im Substrat nachweisbar.

c) Ergebnisse der Bouillonversuche

aa) S. enteritidis

Parallel zu den Versuchen mit teilentrahmter Milch wurden fünf S. enteritidis-Stämme in Standard-II-Nährbouillon überprüft. Im Verhältnis zu den Milchversuchen wurden die Keime in Bouillon in wesentlich stärkerem Umfang durch den Gefriervorgang beeinflußt. Aus Tabelle 18 geht hervor, daß ein Großteil der Stämme bereits nach dem Einfrieren (= 1-Tage-Wert) Keimzahlabnahmen aufwies, die im Bereich von 3 Zehnerpotenzen lagen. In Prozenten ausgedrückt bedeutet dieses in vielen Fällen eine Überlebensrate von weniger als einem Prozent der vor dem Gefrieren im Substrat vorhandenen Salmonellen. Nach unterschiedlichen Zeiträumen konnten nur noch 10^2 Keime/ml reisoliert werden oder aber die Salmonellen waren nicht mehr nachzuweisen. Zu erwähnen ist, daß der Stamm 2823/73 bei der Temperaturmodifikation -40 °C / -12 °C und der Stamm 1406/74 bei der Modifikation -20 °C / -12 °C bereits nach dem Einfrieren vollständig aus dem Substrat eliminiert waren. Nach 180 Tagen waren nur noch diejenigen Stämme - unabhängig von der Temperatur, bei der sie eingefroren bzw. gelagert wurden - nachzuweisen, die auch in hohen Dosen (10^7/ml) eingemischt worden waren.

Tabelle 17

Prozentuale Angabe der Keimzahlen von 5 Salmonella-typhimurium-Stämmen in teilentrahmter Milch (1,5 % Fett) bei unterschiedlichen Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (°C) nach 1 bis 180 Tagen (Einzelwert = Median aus 3 Parallelproben)

→ 100 % = Ausgangskeimzahl (AKZ) = 0 Tage Lagerdauer (in Tagen)

0	1	10	30	60	90	120	150	180

Einfrier-/ /Lagertemp.(°C)	% der AKZ	Salmonella typhimurium (BGA) 318/67	5/74	16/74	11/74	2824/73
-20/-20	100 80 60 40 20 0					
-40/-40	100 80 60 40 20 0					
-20/-12	100 80 60 40 20 0					
-40/-12	100 80 60 40 20 0					
-40/-20	100 80 60 40 20 0					

Tabelle 18

Abnahme der Keimzahlen um Zehnerpotenzen nach dem Einfrieren (1-Tage-Wert) sowie Nachweis nach 180 Tagen (+) von je 5 Salmonella - e n t e r i t i d i s - und Salmonella - t y p h i m u r i u m - Stämmen in Standard – II – Nährbouillon

Salmonella e n t e r i t i d i s				Salmonella t y p h i m u r i u m			
Stamm-bezeich-nung (BGA)	Einfr.-/Gefr.-Lager-temp. (-°C)	Abnahme der Keimzahlen nach dem Einfrieren (1-Tage-Wert)	Nachweis nach 180 Tagen (>10^2/ml)	Stamm-bezeich-nung (BGA)	Einfr.-/Gefr.-Lager-temp. (-°C)	Abnahme der Keimzahlen nach dem Einfrieren (1-Tage-Wert)	Nachweis nach 180 Tagen (>10^2/ml)
Kon-troll-stamm	20/12	o		318/67	20/12	o	
	20/20	--			20/20	-	
	40/12	--			40/12	--	
	40/20	--			40/20	--	+
	40/40	--			40/40	--	
2823/73	20/12	total		5/74	20/12	---	
	20/20	-			20/20	---	+
	40/12	---	+		40/12	---	
	40/20	----			40/20	---	+
	40/40	----	+		40/40	---	+
1406/74	20/12	---		16/74	20/12	---	
	20/20	---			20/20	---	
	40/12	total			40/12	---	
	40/20	---			40/20	---	
	40/40	---			40/40	---	
786/73	20/12	--		11/74	20/12	--	
	20/20	--	+		20/20	--	
	40/12	---			40/12	--	
	40/20	---	+		40/20	---	
	40/40	---	+		40/40	---	
445/73	20/12	---		2824/73	20/12	-	
	20/20	total			20/20	---	+
	40/12	---			40/12	----	
	40/20	---			40/20	---	+
	40/40	---			40/40	--	+

Keimzahlabnahme um Zehnerpotenzen nach dem Einfrieren (1-Tage-Wert):

o = keine (0.0–0.5)
- = 1 (0.5–1.5)
-- = 2 (1.5–2.5)
--- = 3 (2.5–3.5)
---- = 4 (3.5–4.5)
total = keine Keime mehr nachgewiesen

bb) S. typhimurium

Ebenso wie bei den untersuchten S. enteritidis-Stämmen war auch bei S. typhimurium eine initiale Keimreduzierung nach dem Einfrieren (= 1-Tage-Wert) zu bemerken, die bei der überwiegenden Anzahl der Stämme bei 2-3 Zehnerpotenzen lag. Die in hoher Konzentration (10^7 Keime/ml) in das Substrat eingemischten Stämme zeigten teilweise nach 180 Tagen noch überlebende Salmonellen, während die übrigen Stämme nach 10-90 Tagen nicht mehr reisoliert werden konnten.

Stammspezifische oder temperaturbedingte Unterschiede waren sowohl bei S. typhimurium als auch bei S. enteritidis vorhanden, veränderten jedoch nicht die grundsätzliche Tendenz des Verlaufes der Gefrierabtötung.

d) Ergebnisse der Fleischversuche

Versuchsserie I : Versuch 1

Versuch 1 ist als Vorversuch anzusehen, in welchem die Methodik auf ihre Anwendbarkeit überprüft wurde. Da bei diesem Ansatz die Proben nach dem Gefrieren vor der jeweiligen Untersuchung 18 Stunden lang bei + 6 °C im Kühlschrank aufgetaut wurden, sind die Werte mit denen der anderen Versuche nicht zu vergleichen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es während des Auftauens nach einer gewissen Latenz sogar zu Keimzahlerhöhungen gekommen sein kann. Die Auswertung der nach weiteren 6 Stunden Standzeit bei Zimmertemperatur aus dem Homogenisat erneut ermittelten Keimzahlen ergab, daß es, unabhängig von der vorher angewendeten Einfrier- bzw. Gefrierlagertemperatur, zu einer Erhöhung der Keimzahl um durchschnittlich eine Zehnerpotenz im Vergleich zu den sofort nach dem "Auftauvorgang" ermittelten Werten gekommen war. Die Werte lagen zudem über den Ausgangskeimzahlen vor dem Gefrieren.

Versuchsserie I : Versuch 2

aa) S. enteritidis

Die Ergebnisse des Versuches 2 sind in der Tabelle 11 (Seite 61) zusammengefaßt. Der Ansatz mit S. enteritidis ergab bei allen Temperaturmodifikationen ein stufenweises Absinken der Keimzahl nach 10 bzw. 90 Tagen Gefrierlagerung. Die niedrigsten Werte wurden in jedem Falle nach 90 Tagen ermittelt. Bei der Temperaturkombination - 20 °C / - 20 °C wurde nach 10 Tagen ein gegenüber der Ausgangskeimzahl erhöhter Wert von 108 % bei der Reisolierung auf Drigalski - Agar ermittelt. Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Temperaturmodifikationen waren nicht zu bemerken. Die Reisolierungsraten waren auf beiden Nährböden (Standard - II - Nähragar und Drigalski - Agar) annähernd gleich.

bb) S. typhimurium

Wie aus Tabelle 11 (Seite 61) hervorgeht, verlief die Keimreduzierung im Verlauf der Lagerdauer beim Ansatz mit S. typhimurium nicht so eindeutig wie bei S. enteritidis.

Bei der Temperaturmodifikation - 20 °C / - 12 °C wurde auf Drigalski - Agar am 10. Tag ein über die Ausgangskeimzahl erhöhter Wert ermittelt, der jedoch auf Standard - II - Nähragar nicht auftrat. Bei - 20 °C / - 20 °C wurden auf beiden Nährböden nach 90 Tagen höhere Werte gefunden als nach 10 Tagen. Dieses Phänomen trat auch bei der Modifikation - 40 °C / - 20 °C bei der Reisolierung auf Drigalski - Agar auf. Nach dem 90. Tag waren aber die Werte bei allen Temperaturmodifikationen gegenüber der Ausgangskeimzahl erniedrigt. Besonders festzuhalten ist, daß S. typhimurium am Ende des Untersuchungszeitraumes (90 Tage) höhere Reisolierungsraten aufwies als der Parallelansatz mit S. enteritidis und daß auf Drigalski - Agar teilweise höhere Keimzahlen ermittelt wurden als auf Standard - II -

Agar. Eine Erklärung für das Verhalten auf den Nährböden läßt sich vom Versuchsablauf nicht ableiten. Verschiedene Temperaturmodifikationen spielten hinsichtlich einer Keimzahlreduzierung offensichtlich keine Rolle.

Versuchsserie I : Versuche 3 - 6

In den Versuchen 3 - 6 wurde der Einfluß des Faktors Lagerdauer überprüft. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle 12 (Seite 62) zusammengefaßt.

Versuch 3 (- 6 °C / - 6 °C)

aa) S. enteritidis

Bei dieser Versuchsanordnung konnte eine starke initiale Keimreduzierung auf ca. 32 % des Ausgangskeimgehaltes bereits nach dem ersten Tag bemerkt werden. Im Verlauf der Lagerzeit fiel die Keimzahl kontinuierlich ab. Nach 180 Tagen konnten nur noch 9.5 % der vor dem Einfrieren ermittelten Keime festgestellt werden. Die Keimabnahme verlief zwar kontinuierlich, doch wurden vereinzelt, so z.B. nach 60 Tagen, Erhöhungen gegenüber der einen Monat vorher ermittelten Keimzahl festgestellt. Die Reisolierungsraten auf den einzelnen Nährböden (Standard - II - Agar und Drigalski - Agar) wiesen kaum Unterschiede auf.

bb) S. typhimurium

S. typhimurium sank nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) im Schweinehackfleisch sogar auf ca. 14 Prozent des Ausgangskeimgehaltes ab. Die Keimzahl blieb bis zum 60. Tag auf dem etwa gleichen Niveau und sank bis zum Ende der Gefrierlagerung (180 Tage) auf ca. 3.5 % des Ausgangswertes vor dem Gefrieren ab. Die Reisolierungsraten auf den beiden Nährböden waren fast identisch.

Versuch 4 (- 12 °C / - 12 °C)

aa) S. enteritidis

Bei diesem Versuchsansatz konnten nach einem Tag nur noch ca. 6 % der ursprünglich in das Substrat eingemischten Salmonellen reisoliert werden. Im Verlauf der Gefrierlagerung nahmen die Keimzahlen kaum noch weiter ab. Am Ende des Untersuchungszeitraumes (180 Tage) waren die Salmonellen zu ca. 97 % abgetötet. Die Ergebnisse auf Standard - II - Nähragar und auf Drigalski - Agar waren nahezu identisch.

bb) S. typhimurium

S. typhimurium wies gegenüber S. enteritidis leicht erhöhte Reisolierungsraten auf. Die initiale Keimreduzierung durch das Gefrieren (= 1 - Tage - Wert) betrug 87 %. Bis zum 150. Tag wurde dieses Niveau annähernd gehalten. Nach 180 Tagen waren nur noch ca. 6 % des Ausgangskeimgehaltes im Substrat vorhanden. Auf den unterschiedlichen Reisolierungsmedien wurden keine wesentlich voneinander abweichende Ergebnisse erzielt.

Versuch 5 (- 20 °C / - 20 °C)

aa) S. enteritidis

In dieser Versuchsanordnung konnten Keimreduzierungen in der Größenordnung der Versuche 3 und 4 nicht beobachtet werden. Der 1 - Tage - Wert wies nur eine Senkung des Ausgangskeimgehaltes auf die Hälfte auf. Im Verlauf der Gefrierlagerung schwankten die Reisolierungsraten auf Standard - II - Nähragar zwischen 25.4 % (60 Tage) und 46.3 Prozent (30 Tage). Nach 180 Tagen konnten nur noch 39.2 % der vor dem Gefrieren eingemischten Salmonellen wiedergefunden werden. Auf Drigalski - Agar wurden während der gesamten Gefrierlagerdauer - so auch nach 180 Tagen (27.3 %) - geringere Keimzahlen ermittelt.

bb) S. typhimurium

Auch S. typhimurium konnte in größerem Umfang aus dem Substrat isoliert werden, als dies bei den Versuchen 3 und 4 der Fall war. Nach einem Tag wurden im Mittel beider Reisolierungsmedien ca. 52 % der in das Hackfleisch inokulierten Salmonellen wiedergefunden. In der Folge waren auf beiden Nährböden in wechselnder Reihe Keimreduzierungen auf ca. 25 - 45 % des Ausgangskeimgehaltes zu beobachten. Nach 6 Monaten konnten noch 35.8 % (Standard - II - Nähragar) bzw. 44.8 % (Drigalski - Agar) der eingeimpften Salmonellen im Substrat nachgewiesen werden. Auf Drigalski - Agar waren geringfügig höhere Reisolierungsraten zu bemerken.

Versuch 6 (- 40 °C / - 40 °C)

aa) S. enteritidis

Die Reduktionsraten durch das Gefrieren waren bei Versuch 6 noch niedriger als bei Versuch 5 (- 20 °C / - 20 °C). Die initiale Keimabnahme nach einem Tag Gefrieren betrug nur etwa 40 %. Wenngleich auch nach 30 bzw. 90 Tagen nur noch 35 % der eingemischten Keime nachzuweisen waren, so blieb das Keimniveau an den übrigen Untersuchungszeitpunkten auf dem Stand des nach einem Tag ermittelten Wertes. Nach 180 Tagen waren noch immer 60 % der eingeimpften Salmonellen im Schweinehackfleisch vorhanden. Drigalski - Agar brachte dabei etwa die gleichen Resultate wie Standard - II - Nähragar.

bb) S. typhimurium

S. typhimurium wies bei - 40 °C eine gegenüber den übrigen Temperaturen stark erhöhte Gefrierresistenz auf. Die im Mittel beider Nährböden nach dem ersten Tag bestimmte Keimzahl ergab nur eine 15 % - ige Reduktion des Ausgangskeimgehaltes. Im folgenden Untersuchungszeit-

raum war eine einheitliche Keimabnahme nicht zu bemerken. Trotz eines Absinkens der Salmonellenkeimzahl nach dem 150. Tag auf 55.2 % (Standard - II - Nähragar) bzw. 67.5 % (Drigalski - Agar) wurden am 180. Tag noch 88.o bzw. 83.3 % der ursprünglich im Substrat vorhandenen Keime reisoliert. Auf Drigalski - Agar konnten dabei durchschnittlich etwa höhere Werte ermittelt werden.

Eine Zusammenfassung der in den Versuchen 3 - 6 erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 12, Seite 62) zeigt deutlich die Tendenz einer geringeren Keimabnahme bei sinkenden Gefriertemperaturen. Bis auf Versuch 3 (- 6 °C) weisen alle übrigen Versuche erhöhte Reisolierungsraten für S. typhimurium gegenüber S. enteritidis auf. Die Keimzahlausbeute auf Standard - II - Nähragar und Drigalski - Agar war annähernd gleich.

Versuchsserie I : Versuch 7

Im Versuch 7 wurde auf die Überprüfung des Keimverhaltens im Verlauf einer längeren Lagerdauer verzichtet. Stattdessen sollten mehrere Temperaturmodifikationen und das Verhalten der Salmonellen in Rinderhackfleisch untersucht werden. Die Resultate dieses Versuchsansatzes sind aus Tabelle 13 (Seite 63) zu ersehen.

aa) S. enteritidis

Die Tendenz einer erhöhten Keimabnahme bei niedrigen Gefriertemperaturen (- 6 °C und - 12 °C), die bei den Versuchen 3 und 4 mit dem Substrat Schweinehackfleisch erkannt worden ist, konnte in Versuch 7 weder für S. enteritidis noch für S. typhimurium erhärtet werden. Im Gegenteil wiesen beide Salmonella - Stämme bei - 6 °C, - 12 °C sowie bei - 20 °C eine erhöhte und bei - 40 °C / - 12 °C und - 40 °/ - 20 °C eine verringerte Gefrierresistenz auf. Bei den erstgenannten Temperaturen waren nach 30 Tagen im Durch-

schnitt noch 72 %, bei den bei - 40 °C eingefrorenen Proben hingegen nur noch ca. 40 - 50 % des Ausgangskeimgehaltes zu ermitteln. Auch die initiale Keimreduzierung nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) war entschieden geringer. So war bei der Temperatur - 6 °C auf beiden Nährböden nur eine Keimreduzierung um 4 % zu bemerken, während bei - 40 °C nach einem Tag bereits 40 % der Salmonellen abgetötet waren. Die Reisolierungsraten auf den beiden Nährböden unterschieden sich nicht wesentlich.

bb) S. typhimurium

S. typhimurium wurde im Rinderhackfleisch bei - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C noch weniger beeinflußt als S. enteritidis. Bei - 6 °C zeigte sich nach einem Tag, bei - 20 °C nach 10 Tagen sogar eine Erhöhung der Keimzahl über die vor dem Einfrieren ermittelten Werte, die 10 bzw. 17 % betrug. Die aus der gleichen Verdünnungsreihe auf Drigalski - Agar ermittelten Werte lagen jedoch nicht über 100 Prozent. Auch nach 30 Tagen war - 6 °C fast keine Keimabnahme festzustellen. Auf Standard - II - Nähragar wurden 99.3 % und auf Drigalski - Agar 93.3 % der eingeimpften Keime reisoliert. Bei - 12 °C und - 20 °C waren zum gleichen Zeitpunkt nur zwischen 73.3 und 82.7 % der vor dem Gefrieren vorhandenen Salmonellen zu ermitteln. Bei den Temperaturmodifikationen - 40 °C/- 12 °C und - 40 °C/- 20 °C wurde nach einer initialen Keimreduzierung, die in ihrem Ausmaß den bei diesen Temperaturen für S. enteritidis bestimmten Werten entsprach, nach 10 und 30 Tagen eine höhere Keimzahl festgestellt. Das am Ende des Untersuchungszeitraumes (30 Tage) registrierte Keimniveau war bei S. typhimurium deutlich höher als bei S. enteritidis.

Unter Berücksichtigung aller Temperaturmodifikationen erwies sich S. typhimurium als gefrierresistenter als S. enteritidis. Die Keimausbeute auf den beiden Reisolierungsmedien war - abgesehen von vereinzelt auftretenden Unterschieden - durchaus gleichwertig.

Versuchsserie II

In der Versuchsserie II (Versuche 8 - 20) wurde ausschließlich mit S. typhimurium weitergearbeitet. Die Untersuchungen erstreckten sich nur noch auf drei Temperaturen (- 6 °C, - 12 °C und - 20 °C), wurden jedoch parallel mit Rind- und Schweinefleisch durchgeführt. Während bei den Versuchen 8 - 17 vier Stunden alte Keimsuspensionen eingemischt wurden, waren es bei den Versuchen 18 - 20 achtzehn Stunden alte Suspensionen. Bei den letzteren 3 Versuchen wurde lediglich Standard - II - Nähragar als Reisolierungsmedium verwendet.

Versuchsserie II : Versuche 8 - 17

aa) Rindfleisch

In Tabelle 14 (Seite 65) sind die arithmetischen Mittelwerte der durch den Median der Ausgangskeimzahl geteilten Einzelkeimzahlen für die verschiedenen Temperatur - Zeit - Kombinationen aus 10 Versuchsanordnungen zusammengefaßt.

Bei den drei verwendeten Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (- 6 °C, - 12 °C, - 20 °C) wurde bei der Reisolierung der Keime auf Standard - II - Agar ein stufenweises Absinken des Salmonellengehaltes bis zum 30. Tag festgestellt. Die initiale Reduktionsrate durch den Einfrierprozeß (1 - Tage - Wert) belief sich auf Werte zwischen 7 % (- 20 °C) und 12.5 % (- 12 °C). Nach 10 Tagen waren zwischen 15.9 % (- 6 °C) und 26.9 % (- 12 °C) der Keime abgetötet. Die Absterberate nach 30 Tagen betrug bei - 6 °C 36.7 %, während bei - 12 °C und - 20 °C nur 32.2 bzw. 34.4 Prozent ermittelt werden konnten. Die auf Drigalski - Agar vorgenommenen Reisolierungen zeigten die gleiche Tendenz der Keimabnahme, nur lagen sie bei den Untersuchungszeitpunkten '1 Tag' und '10 Tage' um durchschnittlich 2.8 % höher, nach 30 Tagen aber 1.8 % niedriger als vergleichbare Ergebnisse auf Standard - II - Nähragar.

bb) Schweinefleisch

Bei den auf Standard - II - Nähragar ermittelten Keimzahlen schwankte der Grad der initialen Keimreduzierung (= 1 - Tage - Wert) zwischen 24.6 % (- 20 °C) und 28.9 % (- 6 °C). Bei der Erhebung des Keimstatus nach 10 Tagen konnte mit einer Reduktionsrate von 27.8 % bei - 20 °C der niedrigste und mit 34.4 % bei - 6 °C der höchste Wert bestimmt werden. Nach 30 Tagen erreichte die Keimabnahme auch in Schweinefleisch ihren Höhepunkt. Bei - 6 °C waren durch den Gefrierprozeß 41.5 % der ursprünglich eingemischten Keime abgetötet worden. Bei den Temperaturen - 12 °C und - 20 °C waren es 34.5 bzw. 38.6 %.

cc) Unterschiede zwischen Rind- und Schweinefleisch

Bei einem Vergleich der Reisolierungsraten aus Rind- und Schweinefleisch zeigt sich bei den nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) ermittelten Keimzahlen ein deutlicher Unterschied zwischen den Substraten. Ohne den Einfluß unterschiedlicher Temperaturen besonders zu berücksichtigen, wurden im Rindfleisch nach einem Tag Gefriereinwirkung durchschnittlich 16.8 % weniger Salmonellen abgetötet. Dieses Ergebnis wurde mithilfe des Mann - Whitney - Testes auf dem 5 % - Niveau statistisch abgesichert. Nach 10 Tagen wurde die Differenz geringer. Während die Absterberate im Rindfleisch bei - 6 °C und - 20 °C immer noch um 8.3 % geringer war, wurden bei - 12 °C 2.4 % mehr Salmonellen aus dem Schweinefleisch rekultiviert. Nach einem Monat war in beiden Substraten in etwa das gleiche Keimniveau erreicht. Nach 30 Tagen wurden im Rinderhackfleisch 3.8 % weniger Salmonellen abgetötet.

Auf Drigalski - Agar wurden bei analogen Keimzahlbestimmungen verschiedentlich höhere Keimausbeuten als auf Standard - II - Nähragar erzielt.

dd) Ergebnis der Varianzanalysen der Versuche 8 - 17

Es wurden vier dreifaktorielle Varianzanalysen und zwar für die beiden verwendeten Fleischarten (Rind- und Schweinefleisch) jeweils in Verbindung mit den Reisolierungsmedien Standard - II - Agar und Drigalski - Agar durchgeführt. Diese hatten alle den gleichen Aufbau:

Der Faktor A (Gefriertemperaturen) ging mit den Ausprägungen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C, der Faktor B (Lagerdauer) mit den Ausprägungen 1, 10 und 30 Tage in die Analyse ein. Der Faktor C (Versuchsansätze) hatte 10 Ausprägungen, die in einer möglichen unterschiedlichen Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials, sowie in der Höhe der eingemischten Keimsuspensionen bestanden. Um die zwischen den Versuchsansätzen bestehenden Unterschiede so weit als möglich auszugleichen, wurden die Einzelkeimzahlen durch den Median (aus 5 Einzelwerten) der Ausgangskeimzahl der jeweiligen Versuchsanordnung geteilt. Jede Faktorenstufenkombination bestand aus drei Wiederholungen. Insgesamt wurden 1120 Einzelkeimzahlbestimmungen in die Auswertung einbezogen, die in den Tabellen 19 - 22 aufgelistet sind.

Aus den vier Varianzanalysen konnten die gleichen Aussagen getroffen werden. Der Faktor A (unterschiedliche Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen) erwies sich als nicht signifikant, d.h. es konnte kein Einfluß aufgedeckt werden. Der Faktor B (Lagerdauer) konnte hingegen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als signifikant nachgewiesen werden. Ein Überblick über die Höhe der im Verlauf der Lagerdauer erzielten Keimabnahmen ist aus der Tabelle 14 ersichtlich. Es wurde weiterhin ein signifikanter Einfluß des Faktors C (Versuchsansätze) auf dem gleichen Irrtumswahrscheinlichkeitsniveau von 5 % gefunden, d.h. ein Einfluß der einzelnen Versuchsansätze.

Die nachgewiesenen Wechselwirkungen zwischen den Gefriertemperaturen und den einzelnen Versuchsansätzen (AC) zeigen auf, daß die Temperatur bei unterschiedlichen Versuchsansätzen das Keimzahlverhalten beeinflußt. Desgleichen konnten Wechselwirkungen zwischen der Lagerdauer und den sich verändernden Versuchsansätzen (BC) aufgedeckt werden. Wechselwirkungen zwischen Gefriertemperaturen und Lagerdauer (AB) konnten ebenso wenig nachgewiesen werden wie zwischen allen drei Faktoren (ABC).

Aus den Versuchen 8 - 17 lassen sich folgende Erkenntnisse zusammenfassend darstellen:

Unterschiedliche Gefriertemperaturen (- 6 °C, - 12 °C, - 20 °C) schienen keine einheitlichen Veränderungen in den Absterberaten von S. typhimurium (318/67 BGA) bewirkt zu haben. Die Gefrierlagerdauer übte hingegen einen Einfluß auf die Reduktionsraten der Keime aus. Die Keimzahlen wurden am 1., 10. und 30. Tag ermittelt. Das sich von Versuch zu Versuch verändernde Untersuchungsmaterial stellte einen starken Einflußfaktor dar. Es bestehen Wechselwirkungen zwischen Versuchsansätzen und Temperatur sowie zwischen Versuchsansätzen und Lagerdauer.

Der Einfrierprozeß bewirkte im Rindfleisch niedrigere Absterberaten als im Schweinefleisch. Nach 30 Tagen Gefrierlagerung war dieser Unterschied jedoch annähernd ausgeglichen. Ein Vergleich zwischen den Keimausbeuten auf Standard - II - Agar und Drigalski - Agar ergab geringfügig bessere Ergebnisse auf Drigalski - Agar.

Versuchsserie II : Versuche 18 - 20

aa) Rindfleisch

In Tabelle 15 (Seite 66) sind die arithmetischen Mittelwerte der durch den Median der Ausgangskeimzahl geteilten Einzelwerte für die verschiedenen Temperatur - Zeit - Kombinationen aus 3 Versuchsanordnungen zusammengefaßt.

Nach einem Tag Gefrierlagerung wurde bei - 6 °C eine Keimzahlabnahme von 16 % verzeichnet. Die Reduktionsraten bei - 12 °C und - 20 °C waren mit 22.8 % bzw. 26.3 % etwas höher. Nach 10 Tagen war bei - 6 °C mit 19.8 % ebenso wie bei - 12 °C und bei - 20 °C mit 26.2 % bzw. 24.9 % kaum eine Abnahme gegenüber den direkt nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) ermittelten Keimzahlen festzustellen. Am Ende der Gefrierlagerzeit (30 - Tage - Wert) hatte sich der Salmonellengehalt im Rindfleisch in den bei - 6 °C und - 12 °C gelagerten Proben noch immer nicht verändert. Es waren sogar etwas höhere Reisolierungsraten als am 1.

Tabelle 19

Zur Varianzanalyse herangezogene Einzelkeimzahlen (= n · 10^4/g) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinderhackfleisch auf Standard-II-Nähragar als Reisolierungsmedium. Alter der eingem. Kultur 4 Stunden

Versuch Nr.	Minimum / Median / Maximum	Ausgangskeimzahl*	Einfrier-/Gefrierlagertemperatur (°C)								
			-6			-12			-20		
			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)		
			1	10	30	1	10	30	1	10	30
8	Min.	30	21	16	14	21	10	15	22	14	14
	Med.		25	18	14	24	11	16	28	19	16
	Max.		27	20	20	25	18	20	36	23	16
9	Min.	150	130	120	60	100	100	78	130	90	56
	Med.		180	130	62	120	120	100	150	110	60
	Max.		190	130	100	180	140	100	160	140	100
10	Min.	200	120	140	64	130	100	86	120	110	64
	Med.		130	140	66	150	120	100	130	130	110
	Max.		160	150	92	150	150	120	190	130	120
11	Min.	140	90	120	110	150	90	93	100	110	87
	Med.		140	170	170	150	97	150	120	150	140
	Max.		200	230	190	160	130	170	140	170	150
12	Min.	100	80	60	82	74	52	73	86	120	91
	Med.		90	88	85	75	90	77	100	130	98
	Max.		91	100	94	82	94	100	110	150	110
13	Min.	120	110	82	58	68	100	75	70	75	75
	Med.		120	120	60	83	100	100	78	84	90
	Max.		120	130	63	96	110	130	92	100	120
14	Min.	170	130	170	95	100	120	71	90	140	64
	Med.		160	170	120	100	140	85	130	150	140
	Max.		170	280	160	140	160	97	140	170	160
15	Min.	230	190	110	140	200	100	130	190	130	110
	Med.		190	180	160	210	170	150	190	160	110
	Max.		220	220	160	210	210	150	240	180	140
16	Min.	170	130	90	80	170	95	80	160	90	80
	Med.		160	100	80	180	150	110	180	110	120
	Max.		170	170	150	200	150	120	200	140	130
17	Min.	130	110	64	51	140	94	71	160	87	56
	Med.		140	77	59	150	100	80	180	110	65
	Max.		150	95	62	170	120	120	230	120	84

* von den Ausgangskeimzahlen wurde ausschließlich der Median aus je 5 Einzelbestimmungen eingegeben

Tabelle 20

Zur Varianzanalyse herangezogene Einzelkeimzahlen (= n · 10^4/g) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinderhackfleisch auf Drigalski-Agar als Reisolierungsmedium. Alter der eingem. Kultur 4 Stunden

Versuch Nr.	Minimum / Median / Maximum	Ausgangskeimzahl*	Einfrier-/Gefrierlagertemperatur (°C)								
			-6			-12			-20		
			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)		
			1	10	30	1	10	30	1	10	30
8	Min.	26	24	11	12	16	11	10	20	14	10
	Med.		24	17	13	16	16	15	24	14	15
	Max.		29	19	20	21	19	16	27	14	16
9	Min.	130	110	95	51	100	100	70	130	120	58
	Med.		170	120	60	130	120	80	150	130	71
	Max.		190	120	100	140	130	110	170	200	90
10	Min.	190	100	140	60	110	130	78	120	110	75
	Med.		140	140	80	150	130	86	130	120	100
	Max.		150	140	96	160	140	110	150	120	120
11	Min.	150	100	130	120	130	98	77	90	92	93
	Med.		140	210	140	140	120	100	120	130	98
	Max.		180	220	170	160	130	180	140	180	120
12	Min.	98	70	70	53	66	83	81	80	60	95
	Med.		82	81	68	78	90	87	100	98	99
	Max.		100	93	73	80	110	98	110	140	100
13	Min.	110	100	92	55	66	90	68	80	65	79
	Med.		110	120	57	67	98	94	83	80	80
	Max.		120	130	60	75	100	130	90	94	90
14	Min.	150	120	170	110	110	110	78	94	130	83
	Med.		150	170	120	110	120	80	140	140	120
	Max.		170	210	120	150	180	98	140	150	140
15	Min.	230	170	130	110	180	110	100	130	98	94
	Med.		180	190	110	210	130	130	190	140	100
	Max.		210	210	120	220	190	140	220	180	110
16	Min.	150	130	82	50	160	94	80	160	110	90
	Med.		140	92	50	180	120	90	170	120	100
	Max.		170	140	150	210	130	90	190	130	120
17	Min.	120	120	63	49	120	97	77	150	110	62
	Med.		140	64	55	130	100	88	170	110	62
	Max.		150	97	55	190	110	99	210	130	79

* von den Ausgangskeimzahlen wurde ausschließlich der Median aus je 5 Einzelbestimmungen eingegeben

Tabelle 21

Zur Varianzanalyse herangezogene Einzelkeimzahlen (= n . 10^4/g) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Schweinehackfleisch auf Standard-II-Nähragar als Reisolierungsmedium. Alter der eingem. Kultur 4 Stunden

Versuch Nr.	Minimum / Median / Maximum	Ausgangskeimzahl*	Einfrier-/Gefrierlagertemperatur (°C)								
			-6			-12			-20		
			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)		
			1	10	30	1	10	30	1	10	30
8	Min.	26	13	12	13	18	17	16	19	13	14
	Med.		15	14	15	22	27	21	19	16	15
	Max.		16	23	23	33	31	27	28	19	16
9	Min.	180	120	120	55	100	140	100	110	80	55
	Med.		120	140	55	150	180	130	140	100	59
	Max.		200	150	80	230	200	150	140	150	63
10	Min.	180	80	87	37	180	180	60	140	130	74
	Med.		80	100	52	160	160	60	150	150	75
	Max.		150	110	68	130	130	90	150	160	100
11	Min.	170	100	160	45	100	81	92	100	88	67
	Med.		110	190	100	120	83	99	140	95	89
	Max.		140	220	110	150	120	140	150	110	100
12	Min.	100	53	50	47	58	63	42	60	69	51
	Med.		66	84	48	75	86	60	65	120	89
	Max.		88	86	58	85	89	90	66	120	93
13	Min.	130	80	94	75	64	85	75	70	65	80
	Med.		89	100	77	67	99	85	71	72	80
	Max.		89	110	80	90	100	100	90	75	100
14	Min.	200	120	85	160	90	120	110	120	100	98
	Med.		130	93	180	100	120	150	120	150	130
	Max.		160	180	280	130	150	150	130	180	170
15	Min.	260	180	190	130	140	98	120	190	120	140
	Med.		210	250	140	140	140	130	190	150	160
	Max.		230	260	150	150	240	190	260	220	200
16	Min.	200	130	80	90	120	93	120	120	100	90
	Med.		150	92	100	190	95	120	120	120	96
	Max.		150	160	150	200	110	150	140	160	100
17	Min.	140	120	140	100	120	110	70	130	130	110
	Med.		150	160	110	130	140	110	140	150	120
	Max.		150	160	130	130	150	150	190	260	210

* von den Ausgangskeimzahlen wurde ausschließlich der Median aus je 5 Einzelbestimmungen eingegeben

Tabelle 22

Zur Varianzanalyse herangezogene Einzelkeimzahlen (= n • 10^4/g) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Schweinehackfleisch auf Drigalski-Agar als Reisolierungsmedium. Alter der eingem. Kultur 4 Stunden

Versuch Nr.	Minimum / Median / Maximum	Ausgangs-keimzahl*	Einfrier-/Gefrierlagertemperatur (°C)								
			-6			-12			-20		
			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)		
			1	10	30	1	10	30	1	10	30
8	Min.	23	18	14	13	18	20	18	14	14	12
	Med.		22	16	13	19	23	22	19	15	13
	Max.		28	20	22	39	32	27	22	15	15
9	Min.	150	100	120	60	120	150	110	160	87	50
	Med.		110	130	70	180	150	130	180	110	55
	Max.		210	160	90	250	150	150	180	140	180
10	Min.	200	70	67	40	130	120	48	140	120	64
	Med.		72	93	56	160	150	58	150	140	80
	Max.		140	110	70	170	190	77	160	170	100
11	Min.	160	90	140	49	110	84	73	80	82	58
	Med.		110	150	77	130	93	74	130	88	62
	Max.		120	150	91	140	140	140	140	90	94
12	Min.	92	54	62	52	52	68	38	59	60	46
	Med.		60	78	54	65	68	53	65	120	82
	Max.		77	83	54	76	92	65	70	120	90
13	Min.	110	73	95	75	65	84	78	56	68	82
	Med.		88	98	80	68	96	85	79	75	86
	Max.		91	100	81	87	110	89	80	90	90
14	Min.	180	80	100	120	88	110	120	70	140	87
	Med.		98	110	160	100	120	120	110	160	100
	Max.		100	170	260	110	140	140	120	180	150
15	Min.	240	190	190	110	110	110	100	150	100	120
	Med.		200	190	130	120	140	110	170	160	160
	Max.		210	210	190	150	220	200	220	190	190
16	Min.	160	120	85	100	130	90	110	110	80	70
	Med.		140	86	120	160	90	130	130	90	86
	Max.		140	170	130	180	90	130	150	120	91
17	Min.	140	92	130	110	120	96	80	120	110	130
	Med.		140	180	120	120	120	120	120	150	150
	Max.		140	180	140	140	150	130	140	150	190

* von den Ausgangskeimzahlen wurde ausschließlich der Median aus je 5 Einzelbestimmungen eingegeben

bzw. 10. Tag zu erzielen. Lediglich bei - 20 °C war nach 30 Tagen ein leichter Keimabfall auf 61.9 % des Ausgangskeimgehaltes zu bemerken.

bb) Schweinefleisch

Nach dem Gefrieren (= 1 - Tage - Wert) waren Keimabnahmen zwischen 31.9 % (- 20 °C) und 42.2 % (- 12 °C) zu registrieren. Nach 10 Tagen änderte sich das Keimniveau bei allen drei Temperaturen gegenüber dem 1 - Tage - Wert kaum. Auch nach 30 Tagen traten kaum Abweichungen auf. Die Reduktionsraten betrugen 36.5 % (- 6 °C), 42.1 % (- 12 °C) und 38.o % (- 20 °C).

cc) Unterschiede zwischen Rind- und Schweinefleisch

Wie bereits bei den Versuchsansätzen mit Rindfleisch feststellbar, blieb auch im Schweinefleisch das nach dem Einfrieren erreichte Keimniveau bis zum Ende der Untersuchung fast unverändert. Zwischen Rind- und Schweinefleisch bestanden jedoch Unterschiede in der Höhe der Absterberaten von 18 Stunden alten S. typhimurium-Kulturen. Entsprechend den Ergebnissen der Versuche 8 - 17 waren auch bei den Versuchen 18 - 20 niedrigere Reisolierungsraten aus Rindfleisch festzustellen.

dd) Ergebnis der Varianzanalyse der Versuche 18 - 20

Für die Versuche 18 - 20 wurden zwei Varianzanalysen - eine für die Ansätze mit Rind-, die andere für die Ansätze mit Schweinefleisch - durchgeführt. Auf die Verwendung von zwei Reisolierungsmedien wurde in dieser Versuchsreihe verzichtet. Die Faktoren waren mit denen der Versuche 8 - 17 identisch. Lediglich der Faktor C (Versuchsansätze) hatte

nur drei Ausprägungen. Eine Auflistung der in die Analysen einbezogenen 168 Einzelkeimzahlen ist aus Tabelle 23 ersichtlich.

Ein Einfluß des Faktors A (unterschiedliche Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen) konnte wie auch in den Versuchen 8 - 17 nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Versuchen 8 - 17 war jedoch kein signifikanter Einfluß des Faktors B (Lagerdauer) festzustellen. Ein Überblick über das bis zum 30. Tag annähernd gleichbleibende Keimniveau ist aus Tabelle 15 ersichtlich. Ein Einfluß des wiederholten Ansatzes mit variierendem biologischem Material (Faktor C) konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % sowohl für die Ansätze mit Rindfleisch als auch für die entsprechenden Versuche mit Schweinefleisch als signifikant nachgewiesen werden. Wechselwirkungen traten lediglich zwischen dem Faktor B (Lagerdauer) und dem Faktor C (Versuchsansätze) auf.

Zusammenfassend kann für die Versuche 18 - 20 festgestellt werden, daß keine Unterschiede im Verhalten von S. typhimurium (318/67 BGA) bei Anwendung der Gefriertemperaturen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C nachzuweisen waren. Im Gegensatz zu den mit 4 Stunden alten Salmonella - Suspensionen durchgeführten Versuchen 8 - 17 scheint kein Einfluß der Gefrierlagerung bis zum 30. Tag zu bestehen.

Auch in dieser Versuchsreihe stellte das von Ansatz zu Ansatz unterschiedliche Untersuchungsmaterial einen erheblichen Einflußfaktor dar. S. typhimurium überlebte die Einwirkung des Gefrierprozesses im Rindfleisch besser als im Schweinefleisch. Die Keimzahlreduzierungen erfolgten überwiegend durch den eigentlichen Einfrierprozeß.

Tabelle 23

Zur Varianzanalyse herangezogene Einzelkeimzahlen (= $n \cdot 10^4/g$) von Salmonella typhimurium (BGA 318/67) in Rinder- und Schweinehackfleisch auf Standard-II-Nähragar als Reisolierungsmedium. Alter der eingemischten Kultur 18 Stunden

Versuch Nr.	Minimum / Median / Maximum	Ausgangskeimzahl*	Einfrier-/Gefrierlagertemperatur (°C)								
			-6			-12			-20		
			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)			Lagerdauer (Tage)		
			1	10	30	1	10	30	1	10	30
Rinderhackfleisch											
18	Min.	240	200	150	220	180	110	180	160	150	140
	Med.		240	190	265	205	130	220	185	175	180
	Max.		270	320	310	260	230	260	230	210	210
19	Min.	235	190	150	140	170	140	160	150	180	140
	Med.		225	195	190	195	200	190	180	195	200
	Max.		330	240	200	240	240	260	230	210	210
20	Min.	260	93	150	150	100	140	110	98	130	110
	Med.		115	175	180	125	175	185	165	170	145
	Max.		160	190	210	210	260	250	220	230	180
Schweinehackfleisch											
18	Min.	255	210	87	160	140	150	160	170	130	210
	Med.		230	190	210	190	170	180	230	150	240
	Max.		280	230	280	230	230	210	280	240	250
19	Min.	310	110	170	170	160	150	150	110	130	120
	Med.		140	245	180	190	215	175	130	145	135
	Max.		180	260	200	210	270	220	160	180	170
20	Min.	370	180	210	150	110	110	140	200	130	120
	Med.		205	235	165	155	200	160	235	165	140
	Max.		290	270	200	180	260	180	370	240	280

* von den Ausgangskeimzahlen wurde ausschließlich der Median aus je 5 Einzelbestimmungen eingegeben

D. Besprechung der Ergebnisse

Das Fleisch schlachtbarer Haustiere ist ein biologisches Material, das laufenden biochemischen Veränderungen unterworfen und nur schwer standardisierbar ist. Trotzdem muß der Untersucher darauf bedacht sein, möglichst gleichartiges Ausgangsmaterial für Versuche zu erhalten. Aus den vielen Kriterien wurden für die hier vorliegenden Untersuchungen diejenigen herausgesucht, die routinemäßig nachweisbar sind und in der Praxis eine Rolle spielen.

Es wurde nur angereiftes Rindfleisch und gereiftes Schweinefleisch ausgewählt, wie es dem Verbraucher in der Regel angeboten wird. Die üblichen Reifezeiten bei 2 °C bis 4 °C betragen 6 - 10 Tage für Rindfleisch (TÄNDLER, 1973) und 2 - 3 Tage für Schweinefleisch (TÄNDLER u. HEINZ, 1970). Die nach 24 Stunden gemessenen pH - Werte lagen sowohl für Rind- als auch für Schweinefleisch in den nach BARTELS et al. (1968) und v. LOGTESTIJN (1968) noch zu tolerierenden Grenzen, die bei Rindfleisch bei 6.o und bei Schweinefleisch bei 6.2 liegen. BEUTLING (1969) tolerierte sogar einen pH - Endwert (nach 24 Stunden) von 6.4, wobei die Messungen an unterschiedlichen Muskelgruppen Schwankungen aufweisen können (SCHEPER, 1973). Auffällig war allerdings, daß die pH - Werte nach 24 - 48 Stunden mit 6.2 oftmals ziemlich hoch lagen, wobei nach SCHÖN (1974) DFD - Eigenschaften (= dark, firm, dry) unterstellt werden können. Negative Einflüsse auf die Reisolierungsraten von Salmonellen aus gefrorenem Hackfleisch waren aber weder bei diesen hohen pH - Werten noch bei unter pH 6.o absinkenden Werten (GEORGALLA u. HURST, 1963) festzustellen. Es scheint daher angebracht, die von RIECHERT (1940) vertretene Meinung zu akzeptieren, daß die bei normaler Reifung des Fleisches anzutreffenden pH - Werte in einem von Salmonellen tolerierten Bereich liegen.

Nur in wenigen Fällen wurde eine geringgradige Wäßrigkeit des Versuchsfleisches festgestellt. Die Durchfeuchtungszonen lagen aber nur jeweils ca. 1 mm über dem von DRAWER (1966) angegebenen Grenzwert von 2 mm. Die Adspektion der entsprechenden Tierkörper, die aus der Normalschlachtung stammten, hatten zudem keine Hinweise auf akute oder chronische Krankheitsprozesses ergeben, welche in der Regel für erhöhte Wäßrigkeit verantwortlich gemacht werden (DRAWER, 1966). Auch die nach dem ersten Kuttervorgang ermittelte Gesamtkeimzahl der erhöht wäßrigen Versuchsfleischchargen lag in der Norm des übrigen Versuchsgutes und ließ keine Rückschlüsse auf einen krankheitsbedingt erhöhten Keimgehalt zu. Es muß dabei jedoch bedacht werden, daß mit den verwendeten Nährböden auch einige Keimarten nicht hätten erfaßt werden können (REUTER, 1968). Der Grad der Keimabnahme unterschied sich in den Versuchen, in denen mit erhöht wäßrigem Fleisch gearbeitet wurde, auch nicht von dem in anderen Ansätzen.

Der vor dem Beimpfen mit Salmonellen ermittelte Fremdkeimgehalt scheint selbst in einer Höhe von 1 - 2 x 10^4 Keimen / g kein Beeinflussungsfaktor für das Absterben der Salmonellen gewesen zu sein. Ein Vergleich der Ergebnisse, die in den Versuchen mit hohem bzw. niedrigem Fremdkeimgehalt erzielt wurden, läßt keine Tendenz für unterschiedliche Keimabnahmen erkennen. Eine Ausnahme bildet die in Versuch 1 aufgetretene Kontaminationsflora in Kutter II (Tabelle 8). Sie war so hoch und die Zahl der eingeimpften Salmonellen so gering, daß die Möglichkeit einer kompetitiven Hemmung nicht ausgeschlossen werden kann (SPECK et al., 1975). Auch aus diesem Grund können die Keimabnahmen, die in Versuch 1 ermittelt wurden, nicht mit denen anderer Versuche verglichen werden.

Unter den zahlreichen Salmonella - Arten wurden für die vorliegenden Versuche S. enteritidis und S. typhimurium ausgewählt. Beide Species treten oft als Erreger menschlicher Enteritiden auf, wobei S. ty-

phimurium besondere epidemiologische Bedeutung besitzt (PÖHN, 1975; GUINÉE, 1975; BRODHAGE, 1975).

Um nicht einen in seinem Verhalten gegenüber dem Gefrierprozeß atypischen Stamm für die Einmischung in Fleisch zu verwenden, wurde die Gefrierresistenz von jeweils 5 Stämmen von S. enteritidis und S. typhimurium in Standard-II-Bouillon und in teilentrahmter Milch untersucht. Diese Prüfmedien wurden benutzt, weil ihre Zusammensetzung bekannt war und damit Einflüsse eines sich verändernden Substrates ausgeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse der Einfrierversuche haben gezeigt, daß sich die Stämme bei der Einwirkung tiefer Temperaturen ähnlich verhielten. Wie auch von ARPAI (1962), SCHITTENHELM (1964) und SADEK (1973) mitgeteilt wurde, trat der Gefriertod bei allen untersuchten Stämmen in stärkerem Maße zu Beginn der Kälteeinwirkung auf. In deren weiterem Verlauf scheinen als protektiv beschriebene Substanzen wie Milchprotein (ARPAI, 1962; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; MOSS u. SPECK, 1963) und Fleischextrakt (ARPAI, 1962) einen gewissen Einfluß gehabt zu haben. Dieser kam besonders bei den Milchversuchen zum Ausdruck, bei denen in vielen Fällen nach der initialen Gefrierabtötung gleichbleibende oder nur gering veränderte Keimzahlen bis zum 180. Tag auftraten. Individuell bedingte verschiedene Reisolierungsraten können nach BRETZ u. HARTSELL (1958) in einer unterschiedlich starken Denaturierung von Lipid-Protein-Komplexen einzelner Stämme begründet sein. Dabei kann es selbst bei verschiedenen Subkulturen des gleichen Stammes, noch dazu bei einem identischen Versuchsansatz, zu signifikant unterschiedlichen Reisolierungsraten kommen (BRETZ u. HARTSELL, 1958; RAJ u. LISTON, 1961). Da die Milch- und Bouillonversuche nur in einmaligem Ansatz durchgeführt wurden, können endgültige Rückschlüsse auf Eigenheiten einzelner Stämme bei der Anwendung unterschiedlicher Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen nicht getroffen werden. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Tendenz der Keimabnahme durch den Gefriervorgang bei

allen untersuchten Stämmen der beiden in die Wahl genommenen Species annähernd gleich war, wurde für die Fleischversuche jeweils ein Stamm von jeder Species willkürlich ausgewählt.

Bevor eine Wertung der in den Fleischversuchen erhaltenen Ergebnisse erfolgen kann, müssen methodisch bedingte Einflüsse bedacht werden. Dieses ist erforderlich, da die durch das Gefrieren bedingte Reduzierung von Salmonellen im Fleisch im allgemeinen nicht sehr erheblich sein soll (DRÄGER, 1971; SCHMIDT-LORENZ, 1974), und besonders bei Einzelversuchen mit methodisch bedingten Schwankungen zu rechnen ist, durch die entweder tatsächlich erfolgte Keimabnahmen verschleiert oder aber nicht erfolgte Keimreduzierungen vorgetäuscht werden können.

Die Gewinnung eines einheitlich beimpften Untersuchungsmaterials wurde versucht, doch ist nicht ausgeschlossen, daß in den Versuchen bei einzelnen 100 g - Proben Abweichungen vom Median des ermittelten Ausgangskeimgehaltes vorgelegen haben können. Dadurch könnten bei Wiederholungs- oder Reihenuntersuchungen Keimerhöhungen auftreten, die nach dem bisherigen Verlauf nicht zu erwarten waren und theoretisch auch unmöglich sind, da es bei Gefrierlagerung nicht zur Vermehrung von Salmonellen kommen kann (ANGELOTTI et al., 1961; PETZOLD u. SCHEIBNER, 1965; RAY et al., 1972). Solche "Keimerhöhungen", die teilweise sogar über den Ausgangswerten vor dem Gefrieren lagen (z.B. Versuch 2, Tabelle 11), wurden auch von GUNDERSON u. ROSE (1948), RAJ u. LISTON (1961), BUTTIAUX (1972) und KOSSAKOWSKA u. WOJTON (1975) registriert. Mit zunehmender Erfahrung bei der Herstellung beimpfter Prüfsubstrate verringerte sich jedoch die Zahl dieser Ausreißer, so daß doch mit vergleichbaren Werten zu rechnen war.

Ein weiteres methodisches Problem stellte die Probenahme dar. Bei einer Menge von ca. 5 kg pro Versuchsfleischcharge konnten die ersten Proben sowie das Material

für die Bestimmung der Ausgangskeimzahl von unterschiedlichen Bereichen des Versuchsgutes entnommen werden. Diese Möglichkeit ging mit abnehmendem Volumen verloren, so daß die letzten Proben doch in etwa aus dem gleichen Gebiet der Kutterschüssel stammten. Es wurde daher darauf geachtet, daß die letzten Proben nicht alle in einen Plastikbeutel verbracht sondern auf mehrere verteilt wurden.

Ein wichtiges Anliegen war die genaue Registrierung des Einfrierverlaufes. Es zeigte sich, daß zwischen den einzelnen Ansätzen bei gleichen Einfriertemperaturen nicht unerhebliche Schwankungen auftraten. Die Ursache mag darin gelegen haben, daß die Temperaturmessungen in den Proben nicht immer an gleichen Orten der Truhe und des Lagerbeutels vorgenommen wurden. Dies läßt weiterhin darauf schließen, daß zumindestens die bei - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C eingefrorenen Proben nicht gleichmäßig eingefroren wurden, wahrscheinlich durch eine ungenügende Luftumwälzung in den 'Linde - Truhen' bedingt. Naturgemäß kam dieser Befund bei der Temperatur von - 6 °C am stärksten zum Ausdruck. Die in Tabelle 9 angegebenen Mittelwerte der Einfrierzeiten aus 10 Versuchen können also nach oben oder unten abweichen. Während sich die Abweichungen in den Versuchen 8 - 20 vielleicht in Differenzen von etwa 2 Stunden bewegten, traten in den Versuchen 3 - 5, besonders bei - 6 °C und - 12 °C, erhebliche Unterschiede auf, die durch die große Menge des eingelagerten Versuchsgutes (Lagerversuch bis zu 6 Monate) bedingt waren. Auf die Möglichkeit der Beeinflussung des Keimgehaltes durch sehr lange dauernde Einfrierprozesse wird noch an anderer Stelle eingegangen werden. Das Einfrieren der Proben auf - 40 °C ging wesentlich schneller vor sich, da die 'Vötsch - Truhe VLM 04 / 300' mit einer sehr starken Luftumwälzung versehen ist. Wie sich bei einer einmaligen Messung des Einfriervorganges mehrerer unbeimpfter Proben herausstellte, traten bei diesen Proben nur sehr geringfügige Unterschiede auf.

Bei Temperaturregistrierungen mit dem Widerstandsthermometer PT 100 waren maximale Unterschiede von

± 1 °C festzustellen. Die Meßfühler des Systems PT 100 sind jedoch aufgrund ihrer Trägheit für Messungen des Einfriervorganges weniger geeignet, was sich bei Vergleichsuntersuchungen mit Mikrothermoelementen aus Eisen-Konstantan herausstellte. So könnte der während eines Einfriervorganges bei - 20 °C festgestellte Temperaturanstieg nach 30 Minuten bis zu eineinhalb Stunden von - 3 °C auf - 1 °C, der als Kristallisationswärme aufzufassen ist, nur mit den schnell ansprechenden Mikrothermoelementen, nicht aber mit dem System PT 100, registriert werden. Handelsübliche Mikrothermoelemente, z.B. 'Thermocoax' (Philips), haben zudem nur eine Meßabweichung von o.75 % (PHILIPS, 1976). Sie sind allerdings mechanisch labiler als die Meßfühler des Typs PT 100. Die Mikrothermoelemente können jedoch mithilfe einer Kanüle in das Meßgut eingeführt werden, die man anschließend zurückzieht. Dadurch kann an der Meßstelle der Vorteil der geringen Masse des Thermoelementes voll genutzt werden.

Aufgrund der bisherigen Erfahrungen kann zusammenfassend gesagt werden, daß die Verwendung einer speziellen Temperaturprüftruhe und die Temperaturregistrierung mit Mikrothermoelementen der Benutzung von modifizierten Haushaltsgefriergeräten und Widerstandsthermometern des Typs PT 100 vorzuziehen ist, wenn gleichlaufendes Einfrieren und schnelles Registrieren erforderlich ist.

Die bakteriologische Technik wurde in Anlehnung an bereits überprüfte Methoden angewendet. Die mechanische Zerkleinerung der Proben mithilfe des Ultra - Turrax nach Vorschrift ist nach SINELL et al. (1966) eine praktikable Methode für Keimzahlbestimmungen. Da das Probematerial zu Beginn des Homogenisiervorganges noch gefroren war, trat eine Temperaturerhöhung nur sehr langsam ein. Temperaturen über 6 °C wurden nicht beobachtet. Aus diesem Grunde und weil der Zeitraum bis zur Aussaat auf die festen Reisolierungsmedien nicht mehr als 15 Minuten betrug, dürfte weder eine Keimzahlerhöhung noch -reduzierung eingetreten sein. Auch mit einer Reorganisation subletal ge-

schädigter Salmonellen ist in diesem Zeitraum nicht zu rechnen gewesen, da es nach übereinstimmender Ansicht vieler Autoren einer wesentlich längeren Latenzzeit bis zum Beginn von Resuscitationsvorgängen bedurft hätte (SINSKEY et al., 1967; TOMLINS u. ORDAL, 1971; JANSSEN u. BUSTA, 1973; SIEMS, 1974). Nach MOSSEL u. RATTO (1970) ist eine Standzeit von 2 Stunden bei 20 °C erforderlich.

Durch die Vermeidung eines länger dauernden Auftauprozesses sowie der kurzen Zeit, die zwischen Homogenisieren und Kultivierung auf Festmedien verging, war es möglich, ausschließlich die Einflüsse des Einfriervorganges bzw. der Lagerdauer zu untersuchen. Mit einem unkontrollierten Wachstumsbeginn einzelner Zellen hätte das Ergebnis verfälscht werden können (WARSECK et al., 1973; SPECK et al., 1975; v. SCHOTHORST u. v. LEUSDEN, 1975). Die Entnahme des zum Anlegen einer Verdünnungsreihe erforderlichen Materials erfolgte nach dem Vorschlag von UNTERMANN (1967) aus der homogenen Phase des Homogenisats. Dadurch kann das Aufziehen größerer Partikel in das Pipettenlumen vermieden werden. Beim Anlegen der Verdünnungsreihe wurde dem Röhrchenverfahren gegenüber dem Demeterflaschenverfahren der Vorzug gegeben (SINELL et al., 1966), wobei von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe eine neue Pipette genommen wurde, um den von UNTERMANN (1967) erwähnten Verschleppungseffekt zu vermeiden. Die Aussaat auf feste Medien erfolgte im Oberflächenkulturverfahren (SINELL et al., 1965). Die von REUTER (1968) beschriebene Tropftechnik, bei der o.o5 ml auf vorgetrocknete Nährböden aufgetropft und mit der Pipettenspitze verteilt werden, wurde etwas verändert, indem o.1 ml ausgestrichen wurden. Diese Methode hat sich bewährt, da parallel mit dem Spatel ausgestrichene Proben einerseits keine besseren Ergebnisse brachten und das Weglassen des Spatels auf der anderen Seite eine Arbeitserleichterung bedeutete. Für die Rekultivierung von Enterobacteriaceae aus ungefrorenen Substraten hatte REUTER (1968)festgestellt, daß die Ergebnisse auf selektiven Medien denen auf nichtselektiven Kontrollmedien

entsprachen. Diese Verhältnisse sollen aber bei der Kultivierung von Salmonellen und E. c o l i aus gefrorenen Substraten nicht vorliegen (GUNDERSON u. ROSE, 1948; HARTSELL, 1951; HARRIS, 1963; RAY et al., 1971; v. SCHOTHORST u. v. LEUSDEN, 1972; RACCACH u. JUVEN, 1973; JANSSEN u. BUSTA, 1973; SIEMS, 1974). Sowohl in den Versuchen 1 - 7 als auch 8 - 20 konnten bisweilen auf Drigalski - Agar (mit Kristallviolett) gegenüber dem Standard - II - Nähragar gleich hohe oder erhöhte Reisolierungsraten festgestellt werden. Der Drigalski - Agar mit Kristallviolett (LLK - Agar) kann daher dem Standard - II - Nähragar, der in unserem Falle noch mit 5 g Fleischextrakt je l angereichert wurde, als Reisolierungsmedium für Salmonellen aus gefrorenen Substraten durchaus gleichgesetzt werden. Er bietet darüber hinaus sogar noch den Vorteil, ein eventuelles Wachstum von Coliformen gut abgrenzen zu können. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert. Allerdings ist die Selektivität dieses Nährmediums nicht so hoch wie bei anderen, z.B. dem Brillantgrün - Phenolrot - Agar.

Ganz deutliche Unterschiede in der protektiven Wirkung für Salmonellen zeigten sich zwischen Standard - II - Bouillon, teilentrahmter Milch sowie Rind- und Schweinefleisch. Die mit einem relativ geringen Nährstoffangebot versehene Standard - II - Bouillon wies die höchsten Reduzierungsraten auf. Es fiel auf, daß lediglich die in höherer Konzentration eingemischten Stämme bis zum 180. Tag überlebten. Die Ursache könnte nach Angaben von MAJOR et al. (1955), BRETZ (1961), MOSS u. SPECK (1966) und RACCACH u. JUVEN (1973) darin gelegen haben, daß von den in höheren Konzentrationen im Substrat befindlichen Salmonellen auch in größerem Umfange Stoffwechselprodukte freigesetzt wurden. Diese könnten die geringe protektive Wirkung der Standard - II - Bouillon erhöht haben. In teilentrahmter Milch wurden im Verlauf einer halbjährigen Lagerdauer wesentlich geringere Keimabnahmen beobachtet als in Standard - II - Bouillon. Wenngleich eine relativ starke initiale Keimreduktion direkt nach dem Einfrieren bei beiden Substraten

festzustellen war, so schienen in der Milch die als protektiv beschriebenen Substanzen Milchprotein (ARPAI, 1962; NAKAMURA u. DAWSON, 1962; MOSS u. SPECK, 1963) und Laktose (CLEMENT, 1961; POSTGATE u. HUNTER, 1961) wirksam geworden zu sein. Ein möglicher Schutzmechanismus gegen die schädigenden Wirkungen des Gefrierprozesses könnte in Milch auch die Bildung eines von BORGSTRÖM (1961) erwähnten Fettschmierfilmes auf der Oberfläche der Bakterienmembran gewesen sein. In einem hoch protektiven Substrat wie dem rohen Fleisch, in dem aufgrund seiner sehr komplexen Zusammensetzung zahlreiche ineinander übergehende Schutzwirkungen für Mikroorganismen zu erwarten sind, kann selbst bei den als relativ gefrierempfindlich beschriebenen gram-negativen Keimen (BORGSTRÖM, 1961; SCHMIDT-LORENZ u. GUTSCHMIDT, 1968; SCHMIDT-LORENZ, 1974) eine Abtötung bzw. Schädigung nur in geringem Maße auftreten. Dieses wurde von GEORGALLA u. HURST (1963), BUTTIAUX (1972) und KOSSAKOWSKA u. WOJTON (1975) auch für Salmonellen beschrieben. Ein direkter Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen der zuvor genannten Autoren sind aber kaum möglich. Die Ursachen dafür sind unvollständige oder fehlende Angaben über die angewendete Methodik, die in keinem Falle in ihrer Ausführlichkeit an die in dieser Arbeit verwendete heranreichen. Dieses sei an einigen Beispielen aufgezeigt. Die oft zitierte Arbeit von GEORGALLA u. HURST (1963) enthält gar keine methodischen Angaben. Auch BUTTIAUX (1972), der Muskelfleisch mit Salmonellen beimpfte, teilte nichts über den Beimpfungsvorgang sowie über das Vorgehen bei der Rekultivierung der Keime mit. Auch stimmt die bei S. brandenburg nach 2 Tagen aufgetretene Keimerhöhung (Tabelle 3), die wahrscheinlich methodisch bedingt war, bedenklich. Nur die in neuerer Zeit erschienenen polnischen Arbeiten von ZAWADZKI u. POGORZELSKA (1974, 1975) stimmen in der Höhe der nach 30 Tagen erzielten Reduktionsraten für S. typhimurium mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Versuche 8 - 20) in etwa überein. Bei einem Vergleich muß aber berücksichtigt werden, daß wegen des Auftauvorganges bei 4.5 - 5 °C und der

Reisolierung auf dem hochselektiven Salmonella - Shigella - Agar andere Ausgangsbedingungen vorgelegen haben (Tabelle 4). Vergleichende Arbeiten über Unterschiede in der protektiven Wirkung einzelner Fleischarten wurden bisher kaum bekannt. Es ist daher wichtig, festzustellen, daß S. typhimurium in Rindfleisch in größerem Umfang gegen die Einwirkungen des eigentlichen Einfrierprozesses geschützt war als im Schweinefleisch. Die Ursache für dieses Phänomen wird wohl in der Zusammensetzung der beiden Fleischarten zu suchen sein. Es ist denkbar, daß die größere Abtötungsrate der Salmonellen in Schweinefleisch durch den gegenüber dem Rindfleisch erhöhten Fettgehalt bedingt war. In einem Substrat mit stärkerem Fettanteil ist mit einer verringerten Wärmeleitfähigkeit zu rechnen (GRUND, 1976). Durch die verminderte Wärmeleitung des Substrates könnte der schädigende Kristallisationsvorgang länger gedauert haben, wodurch mehr Keime abgetötet wurden als dies im Rindfleisch - mit schnellerer Durchfrierung - der Fall gewesen ist. Im Temperaturbereich um - 2 °C, in dem sich der Kristallisationsprozeß abspielte, waren in den Versuchen bei - 6 °C, - 12 °C und - 40 °C auch verlängerte Einfrierzeiten bei Schweinefleisch festzustellen (Tabellen 9 und 10).

Im Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen stellte BUTTIAUX (1972), allerdings in nicht zerkleinertem Muskelfleisch, eine höhere Schutzwirkung für S. typhimurium und S. brandenburg in Schweinefleisch fest. Da jedoch schon von DIGIROLAMO et al. (1970) mitgeteilt wurde, daß in der Gefrierresistenz von Salmonellen große Unterschiede zwischen unverändertem Substrat und dessen Aufbereitung bestehen können, ist dieses auch für Muskelfleisch und daraus gewonnenes Hackfleisch vorstellbar.

Ein weiterer im Rahmen dieser Arbeit untersuchter Faktor war der Einfluß unterschiedlicher Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen. Hierbei traten einige Widersprüche auf. Während die in Versuch 7 (Tabelle 13) bei

den Temperaturen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C für 18 Stunden alte Kulturen von S. typhimurium erzielten Reduktionsraten in Rindfleisch mit denen der Versuche 18 - 20 durchaus zu vergleichen sind (Tabelle 15), stimmen die in der Versuchsserie I (Versuche 3 - 5, Tabelle 12) für Schweinefleisch erhaltenen Ergebnisse mit denen der Versuchsserie II (Versuche 18 - 20) nicht überein. Die in den Versuchen 3 (- 6 °C) und 4 (- 12 °C) bereits nach dem Einfrieren erzielten Keimabnahmen betrugen zwischen 50 und 85 %. Bei den Versuchen 18 - 20 konnten bei den gleichen Temperaturen in Schweinefleisch im Durchschnitt nur Reduktionen von 36 % registriert werden. Auch bei den mit 4 Stunden alten Kulturen durchgeführten Versuchen 8 - 17 waren die Keimabnahmen bei den Temperaturen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C im Schweinefleisch nicht annähernd so hoch wie in den Versuchen 3 und 4 (Tabellen 12 u. 14). Bei der Anwendung der Temperatur von - 20 °C nivellierten sich die Unterschiede zwischen dem Versuch 5 einerseits und den Versuchen 8 - 20 andererseits. Während die Ergebnisse der Versuche 3 - 6 die in der Literatur experimentell ermittelte Ansicht bekräftigen, daß Mikroorganismen im Temperaturbereich von ± 0 °C bis - 10 °C empfindlicher sind als bei - 20 °C (HARTSELL, 1951; GEORGALLA u. HURST, 1963; SCHMIDT - LORENZ, 1974), konnte dieses Ergebnis in den Versuchen 8 - 20 nicht bestätigt werden. Unterschiedliche Einflüsse der Temperaturen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C konnten auch varianzanalytisch nicht nachgewiesen werden. Dieses ist erklärlich, wenn man bedenkt, daß Einfrierraten von weniger als 1 °C / Minute, wie sie mit Abkühlraten in den geprüften Temperaturbereichen erzielt wurden, im cryobiologischen Sinne als langsames Einfrieren bezeichnet werden müssen (GRUND, 1976). Der Mechanismus der Gefrierschädigung bei der Anwendung von Temperaturen bis - 20 °C ist noch nicht restlos geklärt. Er muß jedoch im Zusammenhang mit einer extrazellulär ablaufenden Eisbildung zu Beginn des Einfrierprozesses gesehen werden (GUNDERSON u. ROSE, 1948; MAZUR, 1966; FENNEMA, 1973). Besonders die Ergebnisse der Versuche 3 - 6 und 18 - 20, aus denen hervor-

geht, daß das Keimniveau nach einer initialen Reduzierung der Salmonellen durch den Einfrierprozeß gleichblieb, scheinen diese Ergebnisse zu bestätigen. Eine Schädigung der Salmonellen durch intrazelluläre Kristallisationsvorgänge, wie sie bei Einfrierraten von mehr als 100 °C / Minute zu erwarten sind, scheint unwahrscheinlich (MAZUR, 1966; NEI et al., 1969; FENNEMA, 1973).

SCHMIDT - LORENZ (1974) und NICKERSON u. SINSKEY (1972) sind jedoch der Ansicht, daß die Ursachen des Gefrierschadens von Bakterien weniger in mechanischen Schädigungen zu suchen sind. Die Autoren vertreten die Meinung, daß es bei einer durch extrazelluläre Kristallisation bedingten Dehydratation der Zellen zu einer Konzentration von Elektrolyten in der ungefrorenen Restlösung kommt. Diese wiederum soll zu irreversiblen Aggregationen und Denaturierungen der Proteinfraktionen der Bakterienzelle führen (LUYETT, 1962). Obwohl bekannt ist, daß mit sinkenden Gefriertemperaturen der Restanteil an ausfrierbarem Wasser in den Zellen immer mehr abnimmt (NICKERSON u. SINSKEY, 1972; SCHMIDT - LORENZ, 1970), scheinen die zwischen den Temperaturen - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C zu erwartenden unterschiedlichen Konzentrationen von Elektrolyten und anderen gelösten Stoffen keine voneinander abweichenden Einflüsse gehabt zu haben. Eine Erklärung für das sehr starke Abnehmen der Keimzahlen in Schweinefleisch bei den Temperaturen - 6 °C und - 12 °C in den Versuchen 3 und 4 (Tabelle 7), welches bei keinem anderen Versuch auch nur annähernd reproduziert werden konnte, mag darin liegen, daß die Versuche 3 und 4 Lagerversuche waren. Dabei wurde gleichzeitig eine große Menge Versuchsfleisch in die hinsichtlich der Gefrierleistung schwächeren 'Linde-Truhen' eingelagert. Der Einfriervorgang dauerte bei diesen Versuchen erheblich länger als bei den Versuchen 8 bis 20. In Versuch 3 (- 6 °C) wurden 48 Stunden bis zum Erreichen der Kerntemperatur benötigt. Die durchschnittliche Einfrierdauer bei den Versuchen 8 - 20 betrug hingegen nur zwischen 21 - 23 Stunden. Die bei den Versuchen 3

und 4 aufgetretenen hohen Abtötungsraten wären erklärbar, wenn man wie HARTSELL (1951), GEORGALLA u. HURST (1963), GISSKE et al. (1964) und SCHMIDT - LORENZ (1974) der Meinung ist, daß in diesen Fällen der kritische Temperaturbereich von ± 0 °C bis - 10 °C besonders langsam durchschritten wurde. Beim Einfrieren bei - 40 °C (Versuch 6) wurde der schädigende Temperaturbereich besonders schnell durchlaufen. Dieses kam in den geringsten Reduktionsraten der vergleichbaren Versuche 3 - 6 zum Ausdruck (Tabelle 12).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die besonders genaue Messung des Einfrierverlaufes in einem Versuch bei - 20 °C mithilfe von schnell ansprechenden Mikrothermoelementen die Möglichkeit aufgezeigt, durch die Registrierung des Zeitraumes und des Temperaturbereiches, in dem die Kristallisationswärme auftritt, auch Dauer und Intensität des möglicherweise entscheidend schädigenden Kristallisationsprozesses näher zu bestimmen. Bei zukünftigen Versuchen muß daher diesem Teilgebiet besondere Beachtung geschenkt werden. Dazu ist die bereits beschriebene Meßtechnik unbedingt erforderlich.

Wegen der bei den ersten Versuchen nur unerheblichen Keimzahlreduzierung bei - 40 °C wurde in der Hauptversuchsserie auf die Anwendung dieser Temperatur verzichtet.

Ein besonderer Einfluß einer von der Einfriertemperatur abweichenden Lagertemperatur (Tabellen 11 und 13) konnte nicht sicher nachgewiesen werden, zumal diese Modifikationen nur in 2 Einzelversuchen geprüft wurden. Die bei den Temperatur - Kombinationen - 20 °C / - 12 °C, - 40 °C / - 12 °C und - 40 °C / - 20 °C erzielten Reduktionsraten entsprachen in etwa denen der übrigen Modifikationen.

Auch während der Gefrierlagerung soll, je nach protektiver Wirkung des umgebenden Substrates, ein mehr oder weniger großer Anteil der Mikroorganismen abgetötet werden (INGRAM, 1951; SCHMIDT - LORENZ, 1974). Aus den Ver-

suchen 3 - 6, in denen der Einfluß der Lagerung länger untersucht wurde, ging hervor, daß die Salmonellen relativ unabhängig von der verwendeten Gefrierlagertemperatur im Verlauf eines halben Jahres ein ziemlich gleichförmiges Verhalten aufwiesen. Im Zeitraum von 10 bis zu 180 Tagen konnten nur noch geringfügige Keimabnahmen festgestellt werden. Sie senkten das bereits nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) erreichte Keimniveau nur noch unerheblich (Tabelle 12). Die von zahlreichen Autoren vertretene Meinung, daß bei Lagertemperaturen bis hinab zu - 10 °C eine stärkere Abnahme der Keimzahl stattfinden soll (HAINES, 1938; WEISER u. OSTERUD, 1945; HUCKER, 1954; BORGSTRÖM, 1955; ARPAI, 1964; KUCHLING, 1966), konnte durch die Versuche 3 und 4 nicht bestätigt werden, bei denen, abgesehen von der starken initialen Keimreduzierung, bei - 6 °C und - 12 °C kaum weitere Keimabnahmen erfolgten.

Es muß jedoch bedacht werden, daß der Grad der Keimreduzierung während der Lagerzeit außer von der protektiven Wirkung des Substrates auch von der Zellkonzentration und den damit verbundenen Stoffwechselprodukten der eingemischten Mikroorganismen abhängen kann (MAZUR, 1966; SCHMIDT - LORENZ, 1974). Aufgrund der in den Versuchen 3 - 6 erhaltenen Ergebnisse wurde später auf die Untersuchung einer längerfristigen Lagerdauer verzichtet. Die bei dieser Versuchsreihe nach 10 und 30 Tagen ermittelten Werte sollten eigentlich nur zur Bestätigung der nach dem Einfrieren (= 1 - Tage - Wert) erhaltenen Keimzahlen dienen. Bei den Versuchen 8 - 17, die im Gegensatz zu den Versuchen 3 - 6 mit 4 Stunden alten Kulturen durchgeführt wurden, machte sich jedoch die Tendenz einer kontinuierlichen Keimabnahme bis zum 30. Tag deutlich bemerkbar (Tabellen 12 und 14). Die stufenweise Reduzierung von S. typhimurium wurde sowohl in zerkleinertem Rindfleisch und, wenn auch etwas weniger deutlich, in Schweinefleisch sichtbar. Der Einfluß des Faktors Lagerdauer wurde varianzanalytisch als signifi-

kant nachgewiesen. Dazu im Gegensatz standen die Ergebnisse der mit identischer Methodik durchgeführten Versuche 18 - 20, jedoch mit der Abweichung, daß, wie in den Versuchen 2 - 7 mit 18 Stunden alten Kulturen von S. typhimurium gearbeitet wurde. Abgesehen von der initialen Keimreduzierung nach dem Gefrieren, die zwar nicht so hoch ausfiel wie in den Versuchen 3 - 5, blieb hier der Salmonellengehalt sowohl in Rind- als auch in Schweinefleisch bis zum 30. Tag auf demselben Niveau. Erwartungsgemäß wurde daher ein Einfluß des Faktors Lagerdauer auch varianzanalytisch nicht nachgewiesen. Es muß also in diesem Zusammenhang auf die Möglichkeit einer unterschiedlichen Beeinflußbarkeit verschieden alter Zellkulturen des gleichen Stammes eingegangen werden. BORGSTRÖM (1961) nahm an, daß das Entwicklungsstadium der Keime das Verhalten gegenüber dem Gefrierprozeß beeinflußt. Seiner Ansicht nach können Unterschiede experimentell nur in Reinkulturen gleichalter Stämme deutlich gemacht werden, da z.B. in Lebensmitteln alle Entwicklungsstadien gleichzeitig vorhanden sein können. Die vorliegenden Versuchsreihen wurden jeweils mit annähernd gleich alten Salmonella-Reinkulturen durchgeführt. Der Einmischungs- und Verpakkungsvorgang führte zwar noch zu geringfügigen Abweichungen, doch dürften nach allgemeiner Erkenntnis die Voraussetzungen zur Erfassung von Unterschieden gegeben gewesen sein. Die von verschiedenen Untersuchern vertretene Ansicht, daß physiologisch junge Zellen aus der frühen logarithmischen Phase sensibler sind als solche aus der späten logarithmischen oder stationären Phase (GORILL u. McNEIL, 1960; STRANGE u. NESS, 1963; MAZUR, 1966; JOHANNSEN, 1972; MARTH, 1973; NICKERSON u. SINSKEY, 1972) kann nach den vorliegenden eigenen Ergebnissen zumindest für S. typhimurium nicht bestätigt werden, denn 4 Stunden alte Kulturen wurden durch den initialen Einfrierprozeß in der Mehrzahl der Versuche in ihrer Zahl geringer beeinflußt als 18 Stunden alte Kulturen. Dafür wurde bei letzteren das Keimniveau im Verlauf der Gefrierlagerung bis zu 30 Tagen kaum noch verändert, während es bei vier

Stunden alte Kulturen kontinuierlich abnahm (Tabellen 14 und 15). Als mögliche hypothetische Folgerung könnte abgeleitet werden, daß kälteanfällige oder ungeschützte Zellen beim Einfluß von Gefriertemperaturen ihre Lebensfähigkeit entweder gleich oder erst im Laufe der Gefrierlagerung bis zum 30. Tag einbüßen. Dieses würde bedeuten, daß der Einfluß des Alters einer Zellkultur auf die Absterberate während einer einmonatigen Gefrierlagerung weitgehend kompensiert wird. Weitere vergleichende Untersuchungen mit verschieden alten Kulturen über einen Zeitraum von 30 Tagen hinaus müßten zur Bestätigung dieser vermutlichen Tendenz noch durchgeführt werden.

Bereits bei den orientierenden Versuchen mit Standard - II - Bouillon und teilentrahmter Milch wurde festgestellt, daß verschiedene Stämme von S. enteritidis und S. typhimurium ein im Prinzip gleichartiges Verhalten gegenüber Gefriereinflüssen aufwiesen, es jedoch Species - bedingte Unterschiede zu geben scheint. Auch bei den Fleischversuchen 2, 5, 6 und 7 konnten höhere Reisolierungsraten für S. typhimurium als für S. enteritidis festgestellt werden. Nur in den Versuchen 3 und 4 wurde eine geringgradig bessere Überlebensrate für S. enteritidis ermittelt. In der Mehrzahl der Versuchsansätze überwog jedoch die bessere Gefrierresistenz von S. typhimurium. Durch die Arbeit von KOSSAKOWSKA u. WOJTON (1975) wurde bekannt, daß die Gefrierresistenz verschiedener Salmonella - Species auch in einem hoch protektiven Substrat wie dem Fleisch nicht unerhebliche Unterschiede aufweisen kann. Während bei S. anatum bis zum 5. Monat der Gefrierlagerung überhaupt keine Keimabnahmen zu erzielen waren, war S. thompson nach 3 Monaten bereits völlig abgetötet.

Da die Einwirkungen des Gefrierprozesses auf einen möglichst gefrierresistenten Stamm überprüft werden sollten, um Mindestangaben über den Umfang einer durch das Gefrieren bedingten Keimabnahme machen zu können, war deshalb in der Hauptversuchsserie (Versuche 8 - 20) auch

nur mit S. typhimurium (318/67 BGA) weitergearbeitet worden.

Aus der bisherigen Diskussion geht hervor, daß die Untersuchungsergebnisse aufgrund der zahlreichen methodischen und biologischen Variationsmöglichkeiten nur dazu verwendet werden können, Tendenzen aufzuzeigen, die jedoch bisher noch nicht für die gesamte Gattung Salmonella als repräsentativ anzusehen sind. Sie liefern jedoch interessante Aussagen über eine Species, und zwar S. typhimurium, die heute als der häufigste und verbreitetste Erreger der Enteritis-Salmonellosen zu betrachten ist.

Die Ergebnisse lassen weiter erkennen, daß es selbst zur Herausarbeitung von Tendenzen einer großen Anzahl von Wiederholungen in sorgfältig geplanten Versuchsansätzen bedarf.

Zur Darstellung der Ergebnisse sei erwähnt, daß die prozentuale Angabe von Keimzahlveränderungen entgegen der heute üblichen Beschreibung in logarithmischen Werten gewählt wurde, um die in der Regel nur geringfügigen Veränderungen besser zum Ausdruck zu bringen. Die Darstellungsweise scheint auch wegen der in zahlreichen Wiederholungsversuchen gewonnenen Genauigkeit berechtigt zu sein. Weiterhin sei darauf hingewiesen, daß die Bewertbarkeit aller Versuchsergebnisse nicht gleich ist. Die Versuche 1-7 müssen trotz der höheren Probenzahl bei den Einzelversuchen in ihrer Aussagekraft geringer bewertet werden. Da sie jedoch dem Ziel dienten, die für einen endgültigen Versuchsansatz erfolgversprechenden Untersuchungsfaktoren auszuwählen, wurden ihre Ergebnisse unter Angabe des Medians tabellarisch dargestellt und auch diskutiert. Um die in den Versuchen 8-20 bei der Varianzanalyse aufgetretenen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Faktoren, die jedoch die bereits erkannte Gesamttendenz nicht veränderten, nicht ungerechtfertigt überzubewerten, wurden die Versuchsansätze 8-17 und 18

bis 20 nicht als Einzelversuche, sondern in ihrer Gesamtheit ausgewertet und auch entsprechend tabellarisch dargestellt (Tabellen 14 und 15). Die als gültig beschriebenen Tendenzen basieren also in erster Linie auf der Bewertung der Gesamtheit der Versuchsansätze 8 - 20.

Hinsichtlich der Bedeutung einer Verbesserung des Gesundheitsschutzes des Menschen durch das Gefrieren von Fleisch schlachtbarer Haustiere sei gesagt, daß die Abtötungsrate von Salmonellen bei der Anwendung von Gefriertemperaturen, wie sie in der Fleischtechnologie angewendet werden können, nur geringgradig ist und noch dazu von Fall zu Fall außerordentlich schwanken kann. Eine vollständige Abtötung von Salmonellen im Fleisch schlachtbarer Haustiere scheint nicht möglich zu sein. Dieses wurde für hohe Konzentrationen an eingemischten Keimen ebenso festgestellt wie für niedrigere (GEORGALLA u. HURST, 1963; BUTTIAUX, 1972; ZAWADZKI u. POGORZELSKA, 1974, 1975; KOSAKOWSKA u. WOJTON, 1975). Eine Übersicht über die in die Varianzanalyse eingegangenen Einzelwerte der Versuche 8 - 20 (Tabellen 19 - 23) zeigt, daß selbst Reduzierungen in Größenordnungen um 50 % bei Ausgangskeimzahlen von 1 bis 2 x 10^6 Salmonellen / g keinesfalls mit einer genügenden Verringerung der Infektionsgefahr gleichzusetzen ist. 6 x 10^5 Salmonellen / g sind epidemiologisch noch genau so bedenklich (BRODHAGE, 1969; BADER, 1972; NOSKOWA, 1976). Nach d'AOUST u. PIVNICK (1976) sind sogar Enteritis - Salmonellosen durch 100 Keime / g kontaminiertes Lebensmittel hervorgerufen worden.

In den vorliegenden Versuchen wurden bewußt hohe Einmischungswerte gewählt, um die Absterberate so genau wie möglich zu erfassen. In der Praxis dürfte im Fleisch allerdings nur mit wesentlich niedrigeren Salmonella - Zahlen zu rechnen sein. 10^2 Salmonellen / g wäre dabei schon ein hoher Wert. In einem solchen Bereich könnten die in der vorliegenden Arbeit in manchen Fällen erziel-

ten Abtötungsraten allerdings schon zu einem verminderten Infektionsrisiko führen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß es bei unsachgemäßer Weiterbehandlung des Fleisches nach einer gewissen Latenzzeit schnell wieder zu einem logarithmischen Wachstum der noch im Substrat verbliebenen Salmonellen kommen kann (SINSKEY et al., 1967; TOMLINS u. ORDAL, 1971; RAY et al., 1971; 1972; JANSSEN u. BUSTA, 1973; SIEMS, 1974). Der Meinung von DRÄGER (1971) ist zuzustimmen, daß das Gefrieren keinesfalls als sicheres Mittel zum Abtöten von Keimen im Fleisch schlachtbarer Haustiere anzusehen ist. Eine teilweise Reduzierung des Gehaltes an Salmonellen im Fleisch kann jedoch ein Element im Salmonellenbekämpfungsprogramm darstellen, an das sich der Epidemiologe halten kann, solange das Problem der starken Salmonellenausbreitung in Lebensmitteln tierischer Herkunft nicht anderweitig abgestellt werden kann.

E. Schlußfolgerungen

Die Höhe der durch den Gefrierprozeß zu erzielenden Reduktionsraten hängt von der unterschiedlichen protektiven Wirkung des mit den Erregern beimpften Substrates ab. Während die höchsten Keimabnahmen in flüssigen künstlichen Nährmedien zu erreichen sind, niedrigere in teilentrahmter Milch, sind sie vergleichsweise gering in zerkleinertem Rind- und Schweinefleisch. Aber selbst zwischen diesen beiden Fleischarten scheinen Unterschiede zu bestehen. S. typhimurium (318/67 BGA) nimmt in Rindfleisch weniger an Zahl ab als in Schweinefleisch. Möglicherweise ist im Schweinefleisch mit seinem höheren Fettgehalt die Gefrierphase verzögert, wofür sich Anhaltspunkte durch Unterschiede in der mit Mikrothermoelementen gemessenen Kristallisationswärme finden lassen.

Auch zwischen verschiedenen Species der Gattung Salmonella scheinen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Gefrierprozessen zu bestehen. S. enteritidis ist wahrscheinlich empfindlicher als S. typhimurium. Verschiedene Stämme dieser beiden Species scheinen in ihrem Verhalten aber weitgehend gleich zu sein.

Ein Einfluß des Alters der eingefrorenen Bakterienkultur auf die Höhe der Überlebensrate scheint zu bestehen. Vier Stunden alte Kulturen von S. typhimurium überlebten den Einfrierprozeß in höherer Zahl als 18 Stunden alte Kulturen.

Eine Keimzahlreduzierung erfolgt aber nicht nur während des Einfriervorganges. Im Verlauf der Gefrierlagerung verliert ein weiterer Anteil von Salmonellen seine Lebensfähigkeit. Dabei sind offensichtlich ebenfalls Unterschiede durch das Alter der eingemischten Kultur bedingt. Vier Stunden alte Kulturen von S. typhimurium sind empfindlicher als 18 Stunden alte

Kulturen. Bis zum überprüften Zeitpunkt von 30 Tagen kam es allerdings bei S. typhimurium zu einem Ausgleich zwischen unterschiedlichen Keimzahlreduzierungen während des Einfrierprozesses und der Gefrierlagerung.

Unterschiedliche Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen im Bereich von - 6 °C bis - 20 °C haben offenbar keine voneinander abweichenden Einflüsse auf die Reduzierungsraten. Die dabei erreichten Einfriergeschwindigkeiten unterhalb von 1 °C / Minute müssen im cryobiologischen Sinne als langsamer Einfrierprozeß bezeichnet werden.

Weder der Einfriervorgang noch eine Gefrierlagerung vermögen eine vollständige Abtötung der Salmonellen zu bewirken. Dieses gilt für die experimentell geprüften hohen Konzentrationen (10^6 Zellen / g Fleisch). Nach Literaturhinweisen ist bei niedrigeren Keimgehalten in Kulturen mit einer höheren Absterberate zu rechnen. Derartige Untersuchungen am Substrat Fleisch erfordern besondere Versuchsanordnungen und können nur nachfolgend geprüft werden.

Das Gefrieren von intravital oder postmortal mit Salmonellen infiziertem Fleisch ist, wenn überhaupt, nur in Verbindung mit anderen Hygienemaßnahmen als Mittel zur Herabsetzung der Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers zu bezeichnen.

F. Zusammenfassung

Das Problem der Salmonellose als Zoonose in den Nutztierbeständen ist nicht beseitigt. Akut und latent mit den Erregern infizierte Schlachttiere stellen eine große Infektionsgefahr für den Verbraucher dar. Die bisher im Rahmen der Amtlichen Schlachttier- und Fleischuntersuchung angewendeten Maßnahmen können die Gesundheitsgefährdung des Menschen nicht ausschließen. Es galt daher, zu prüfen, ob die durch den Gefrierprozeß zu erzielenden Keimzahlabnahmen von Salmonellen im Fleisch das Infektionsrisiko vermindern.

In Vorversuchen wurde die Gefrierresistenz je fünf verschiedener Stämme von S. enteritidis und S. typhimurium in einem einfachen flüssigen Kulturmedium und in teilentrahmter Milch (1.5 % Fett) überprüft. Trotz grundsätzlich ähnlichem Verhalten bei der Einwirkung von Gefriertemperaturen waren sowohl zwischen den beiden Species als auch den verschiedenen Stämmen der beiden Species geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Gefrierprozessen festzustellen. In einfacher Nährbouillon wurden wesentlich höhere Abtötungsraten erzielt als in teilentrahmter Milch.

In 20 Versuchen wurden entweder 4 Stunden oder 18 Stunden alte Kulturen je eines ausgewählten Versuchsstammes von S. enteritidis (Kontr. BGA) und S. typhimurium (318 / 67 BGA) in zerkleinertes Rind- und Schweinefleisch eingemischt. Nach Bestimmung der Ausgangskeimzahl wurden in Aluminiumfolie verpackte 100 g - Proben bei den Temperaturmodifikationen - 6 °C, - 12 °C, - 20 °C, - 40 °C, - 20 °C / - 12 °C, - 40 °C /- 12 °C und - 40 °C /- 20 °C eingefroren und gelagert. Nach einem bzw. 10 und 30 Tagen sowie bei einigen Versuchsansätzen in weiteren monatlichen Abständen wurden direkt nach Entnahme aus den Gefriertruhen quantitative Keimzahlbestimmungen durchgeführt.

Während die Versuche 1 - 7 nur beschreibend bewertet wurden, erfolgte bei den Ansätzen 8 - 20 eine varianzanalytische Auswertung.

S. typhimurium wies in der Mehrzahl der Versuchsansätze im Vergleich zu S. enteritidis eine geringere Empfindlichkeit gegen Gefriertemperaturen auf. Das Alter einer Kultur schien einen Einfluß auf die Absterberate gehabt zu haben. In den Versuchen 8 - 20 wurden 18 Stunden alte Kulturen durch den eigentlichen Einfriervorgang (= 1 - Tage - Wert) sowohl im Rindfleisch als auch im Schweinefleisch bei weitem stärker beeinflußt als vier Stunden alte Kulturen (vier Stunden: 17.7 %; achtzehn Stunden: 28.8 %). Dieser Effekt muß jedoch aufgrund der geringen Anzahl vergleichbarer Versuchsansätze mit 18 Stunden alten Kulturen als noch zufällig betrachtet werden. Während die physiologisch jüngeren Kulturen im Verlauf der anschließenden Gefrierlagerung bei fast allen Temperaturmodifikationen kontinuierlich reduziert wurden, und dieser Lagereinfluß auch varianzanalytisch als signifikant nachgewiesen werden konnte, hielten die älteren Kulturen in etwa ihr Keimniveau, so daß nach 30 Tagen annähernd gleich hohe Absterberaten zu verzeichnen waren. Die durchschnittliche Keimzahlreduzierung betrug zu diesem Zeitpunkt bei den Rindfleischproben (4 Std.: 34.4 %, 18 Std.: 21.7 %), bei den Schweinefleischproben (4 Std.: 38.2 %, 18 Std.: 38.4 %).

S. typhimurium wurde durch den Gefrierprozeß im Rindfleisch in geringerem Umfang abgetötet als im Schweinefleisch. Der Unterschied betrug bei den Versuchen 8 - 17 (4 Stunden - Kulturen) nach dem Einfrieren (1 Tage - Wert) 16.8 % und ließ sich, bezogen auf jeweils 10 Wiederholungen, bei denen beide Fleischarten parallel verwandt wurden, mithilfe des Mann - Whitney - Testes auf dem 5 % - Niveau statistisch sichern. Der nach 30 Tagen bei derselben Versuchsreihe aufgetretene Unterschied von 3.8 % muß dagegen als zufällig angesehen werden.

Unterschiedliche Einfrier- und Gefrierlagertemperaturen (- 6 °C, - 12 °C, - 20 °C) hatten keinen varianzanalytisch nachweisbaren Einfluß auf das Verhalten der Keimzahlen im Substrat Fleisch.

In Vorversuchsreihen (Versuche 3 - 6), bei denen nicht mit genügend Wiederholungen gearbeitet worden war, waren Anzeichen dafür vorhanden, daß konstant angewandte Temperaturen von - 40 °C (Versuch 6) im Vergleich zu - 6 °C, - 12 °C und - 20 °C die Reduzierungsraten verringern, schwankende Temperaturen dicht unterhalb des Gefrierpunktes (Versuche 3 und 4) dieselben erhöhen. Allerdings konnten die in den Versuchen 3 und 4 nach dem Einfrieren ermittelten Keimzahlabnahmen (50 - 85 %) in keinem der varianzanalytisch ausgewerteten Versuche reproduziert werden. Im Rahmen der Vorversuchsserie wurde weiterhin bemerkt, daß die in einer Konzentration von 10^6 Keimen / g in Schweinefleisch eingemischten 18 Stunden alten Kulturen während einer halbjährigen Lagerdauer nur in geringem Maße weiter reduziert wurden. Der entscheidende Faktor für die Gefrierabtötung von Salmonellen war der eigentliche Einfrierprozeß.

Allgemein läßt sich aus den vorliegenden Versuchen die Erkenntnis ableiten, daß der Einfriervorgang wie auch die Gefrierlagerung bis zu 180 Tagen keine vollständige Abtötung der Salmonellen in Rind- und Schweinefleisch, jedoch eine Reduzierung in einem nicht allgemein festzulegenden Prozentsatz bewirken. Das Gefrieren von intravital oder postmortal mit den Erregern infiziertem Fleisch ist, wenn überhaupt, nur in Verbindung mit anderen Hygienemaßnahmen als Mittel zur Herabsetzung der Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers anzusehen.

Summary

The problem of salmonellosis, occuring as zoonosis in live - stock has not yet been removed.

Infected animals are a great danger for consumers. Official controls of fat - stock as well as meat - inspection can not exclude hazards to human beings. Therefore the aim of this thesis was to check, whether the infection hazard could be reduced by freezing of carcass meat.

In a series of pilot tests the resistance of five different strains of S. enteritidis and S. typhimurium to low temperatures was investigated. The culture media in those tests were nutrient - broth and non - fat milk (1.5 % fat).

It was realized that both species as well as their different strains were generally influenced in nearly the same manner, although there seemed to be small differences in resistance to low temperature treatment. The killing rate was much higher in nutrient - broth than in non - fat milk. In a series of 20 experiments both 4 and 18 hours - strains of S. enteritidis (control BGA) and S. typhimurium (318 / 67 BGA) were inoculated into beef and pork meat. After initial Salmonella counts 100 g - samples of comminuted meat were wrapped in aluminium foil and frozen in different freezing units at - 6 °C, - 12 °C, - 20 °C and - 40 °C. In some experiments samples were frozen at - 20 °C and - 40 °C and then stored at different temperatures (- 12 °C and - 20 °C). Samples were removed from the freezers after 24 h, 10 d, 30 d as well as, in a series of tests in monthly intervals up to 180 d. Directly after removing Salmonella counts were carried out. While experiments 1 - 7 were only described, an analysis of variance was made for the others (8 - 20).

In most experiments where both species were tested simultaneously S. enteritidis seemed to be less resistant against freezing temperatures than S. typhimurium.

The age of cell cultures seemed to be of importance for the results obtained. In the experiments 8 - 20

18 hours - cultures inoculated into beef and pork were more influenced by the actual freezing process (1 day - level) than 4 hours - cultures (4 h : 17.7 %; 18 h : 28.8 %). Because of the small number of comparable tests with 18 hours - cultures this effect must be considered to be statistically still accidental.

During freeze - storage younger cells were continuously reduced in number, wheras older ones remained fairly steady. This effect could be proved in the analysis of variance. After 30 d the initial difference in the killing rate between 4 hours - and 18 hours - cultures was approximately balanced. The mean reduction - rate of Salmonella on a non - selective medium was (4 h : 34.4 %; 18 h : 21.7 %) in beef and (4 h : 38.2 %; 18 h : 38.4 %) in pork samples. S. typhimurium was reduced less by freezing in beef than in pork meat. The difference of 16.8 % was established statistically by the MANN - WHITNEY - Test (5 % - level) in a series of 10 similar experiments (8 - 17) after one day of freezing. After 30 d the above mentioned difference minimized to 3.8 % which must be regarded as accidental. Statistically significant differences between different freezing and storage temperatures (- 6 °C, - 12 °C, - 20 °C) could not be proved.

In another series of pilot tests (3 - 6), there were indications that a constantly applied temperature of - 40 °C cuts the reduction rate, wheras a temperature just below the freezing point increases it. The reduction rates of 50 - 85 % obtained in the pilot tests 3 and 4 could, however, not be reproduced in any of the biometrically planned experiments. The pilot tests 3 - 6 also showed that in massively inoculated pork meat 18 hours - cultures of S. enteritidis and S. typhimurium were only slightly reduced in number during half year's storage. The most important factor influencing the killing rate was the actual freezing process.

The general conclusion can be drawn that neither the actual freezing process nor freeze - storage up to 180 days result in a complete killing of Salmonella in contaminated meat. The reduction rate obtained by freezing is dependent on various factors and can not be determined generally. Freezing of contaminated meat can not be used as the only means of reducing the infection hazard to human beings and should - if at all - only be applied in a combination with other sanitary measures.

AEA, R.T. u. BUSHNELL, O.A.

Survival times of selected enteropathogenic bacteria in frozen passion fruit nectar base

Appl. Microbiol. 10, 277 - 279 (1962)

ALFORD, J.A. u. PALUMBO, S.A.

Interaction of salt, pH, and temperature on the growth and survival of Salmonellae in ground pork

Appl. Microbiol. 17, 528 - 532 (1969)

ALFORD, J.A. u. KNIGHT, N.L.

Interrelationship of incidence, isolation procedure, and survival in frozen ground pork of 25 salmonellae serotypes

Food Sci. Technol. Abstr. 2, 1343 (1970)

ALTERAUGE, W.

Mit Salmonellen infiziertes Hackfleisch als Ursache einer Lebensmittelvergiftung

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 69 (1971)

ANDERS, W.

Epidemiologie der Salmonelloseausbrüche in der Bundesrepublik Deutschland 1965 - 1968

in: 'Die Epidemiologie der Salmonellosen', Verl. G. Fischer, Stuttgart, 1971

ANGELOTTI, R.J. - FOTER, J.F. - LEWIS, K.H.

Time temperature effects on Salmonellae and Staphylococci in foods

Amer. J. Publ. Hlth. 51, 76 - 88 (1961)

ARPAI, J.

Nonlethal freezing injury to metabolism and motility of Pseudomonas fluorescens and E. coli

Appl. Microbiol. 10, 297 - 301 (1962)

ders.

Zur Problematik mikrobieller Normen für tiefgefrorene Lebensmittel

Kälte 18, 53 - 56 (1965)

ASHWOOD - SMITH, M.J.

On the stability of bacteria to freezing and thawing

Cryobiol. 2, 39 - 43 (1965)

AZUMA, Y. - NEWTON, S.B. - WITZER, L.D.

Production of psychrophilic mutants from mesophilic bacteria by ultraviolet irradiation

J. Dairy Sci. 45, 1529 - 1530 (1962)

BAARS, J.C.

Zu einigen bedeutenden Infektionskrankheiten bei Zucht- und Mastkälbern in den Niederlanden

Bull. Off. Int. Epizootics 69, 1959 - 1969 (1968)

BADER, R.E.

Antibiotika bei Salmonellosen

Dtsche. Med. Wschr. 97, 212 (1972)

BAIRD - PARKER, A.C. u. DAVENPORT, E.

The effect of recovery on the isolation of Staphylococcus aureus after heat treatment and after the storage of frozen dried cells

J. appl. Bact. 28, 390 - 402 (1965)

BARTELS, H. - BERGMANN, G. - HADLOK, R. - WAGEMANN, H.

Die Untersuchung der Schlachttiere und des Fleisches

Verl. P. Parey, Berlin, 1968

BATE - SMITH, E.C.

Progress in the freezing and chilling of foods

J. Fd. Technol. 2, 191 - 206 (1967)

BEER, J.

Epidemiologie der Salmonellen in veterinärmedizinischer seuchenhygienischer Sicht

Mh. Vet. Med. 22, 204 - 209 (1967)

BEUCHAT, L.R. u. HEATON, E.K.

Salmonella survival on pecans as influenced by processing and storage conditions

Appl. Microbiol. 29, 795 - 801 (1975)

BEUTLING, D.

Zu Fragen der Fleischqualität beim Fleischschwein; 1. Mitt.: Fleischfarbe und pH - Wert

Mh. Vet. Med. 24, 61 - 67 (1969)

BISCHOFF, J.

Über eine in Hamburg durch S. typhimurium hervorgerufene Lebensmittelvergiftung durch Rindfleisch aus einem Notschlachtungsbetrieb

Arch. Lebensmittelhyg. 7, 217 - 218 (1956)

BOHNHOFF, M. u. MILLER, C.Ph.

Enhanced susceptibility to Salmonella infection in streptomycin treated mice

J. Infect. Dis. 111, 117 - 123 (1962)

BORGSTRÖM, G.

Microbiological problems of frozen food products

Adv. Fd. Res. 6, 163 - 230 (1955)

ders.

Unsolved problems in frozen food microbiology

Proc. Low Temperature Microbiol. Symp. Campbell Soup Comp. - Camden, New Jersey, 1961

BORNEFF, J. u. KIETZMANN, G.

Untersuchungen über das Absterben von Mikroorganismen bei der Speiseeisbereitung und Lagerung

Zbl. Bakt. I Orig. B 160, 69 - 83 (1975)

BRETZ, H.W.

Death of E. coli frozen on cellophane and on membrane filters

Can. J. Microbiol. 7, 793 - 798 (1961)

BRETZ, H.W. u. HARTSELL, S.E.

Quantitative valuation of defrosted E. coli

Food Res. 24, 369 - 375 (1959)

BRODHAGE, H.

Durch Bakterien verursachte Lebensmittelvergiftungen bzw. -infektionen

Alimenta 8, 150 - 153 (1969)

ders.
Die Epidemiologie der Salmonellosen
Verl. S. Fischer, Stuttgart, 1971

ders.
Epidemiologie der Salmonellosen in der Schweiz
Bundesgesundheitsbl. 18, 399 - 405 (1975)

BULLING, E.
Die Bedeutung und Bekämpfung der Salmonella - Infektionen bei Mensch, Tier und Lebensmitteln tierischer Herkunft
Bundesgesundheitsbl. 11, 375 - 387 (1968)

ders.
Verhütung und Bekämpfung der Salmonellose aus veterinärmedizinischer Sicht - lebensmittel- und tierseuchenrechtliche Aspekte
Bundesgesundheitsbl. 19, 281 - 282 (1976)

BULLING, E. u. PIETZSCH, O.
Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus fünfjährigen Salmonellose - Untersuchungen
Zbl. Vet. Med. B 15, 913 - 954 (1968)

BUTTIAUX, M.
Congélation industrielle des viandes et abats de porcins et de bovides
Rev. Gén. Froid 63, 115 - 119 (1972)

BUXTON, J.C.
Salmonellosis in calves
Vet. Rec. 72, 640 - 642 (1961)

CALCOTT, P.H. u. McLEOD, R.A.
The survival of E. coli from freeze - thaw damage: a theoretical and practical study
Can. J. Microbiol. 20, 671 - 681 (1974)

dies.
The survival of E. coli from freeze - thaw damage: permeability barrier damage and viability
Can. J. Microbiol. 21, 1724 - 1732 (1975)

dies.

The survival of E. coli from freeze - thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage

Can. J. Microbiol. 21, 1960 - 1968 (1975)

CALCOTT, P.H. - LEE, S.K. - McLEOD, R.A.

The effect of cooling and warming rates on the survival of a variety of bacteria

Can. J. Microbiol. 22, 106 - 109 (1976)

CASELITZ, F.H.

Epidemiologische Feststellungen bei Pferdefleischvergiftungen

Zbl. Bakt. I Orig. A 155, 229 - 233 (1950)

CHUNG, K.C. u. GOEPFERT, J.M.

Growth of Salmonella at low pH

J. Fd. Sci. 35, 326 (1970)
ref. in: Fleischwirtschaft 52, 1604 (1972)

CLEMENT, M.T.

Effects of freezing, freeze - drying and storage in the freeze - dried and frozen state on viability of E. coli cells

Can. J. Microbiol. 7, 99 - 106 (1961)

d'AOUST, J.Y. u. PIVNICK, H.

Small infectious dose of Salmonella

Lancet I, S. 866, Heft 17 (1966)

DIGIROLAMO, R. - MATCHES, J. - LISTON, J.

The effects of freezing on the survival of Salmonella and E. coli in pacific oysters

J. Fd. Sci. 35, 13 - 16 (1970)

DIMMLING, Th.

Die Lebensmittelinfektionen und Vergiftungen aus der Sicht des Hygienikers

Öff. Gesundh. Wesen 32, 468 - 470 (197o)

DOEBBLER, G.F. u. RINFRET, A.D.

Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing

J. Bact. 85, 485 (1963)

DRÄGER, H.

Salmonellosen, ihre Entstehung und Verhütung

Akademie - Verlag Berlin, 1971

DRAWER, K.

Praktische Erfahrungen mit kombinierten Hilfsuntersuchungsmethoden zur Feststellung von Fleischmängeln bei Not- und Krankschlachtungen

Fleischwirtschaft 46, 790 - 792 (1966)

DUBOS, R. u. SCHÄDLER, G.

The effect of the intestinal flora on the growth - rate of mice and their susceptibility to experimental infections

J. Infect. Dis. 111, 407 - 410 (1960)

EDDY, B.P. u. KITCHELL, A.G.

Cold tolerant fermentative gram negative organisms from meat and other sources

J. appl. Bact. 22, 57 - 63 (1959)

EDEL, W. u. KAMPELMACHER, E.H.

Salmonella infections in fattening calves in their farm

Zbl. Vet. Med. B 18, 617 - 621 (1971)

dies.

The role of effluents in the spread of Salmonellae

Zbl. Bakt. I Orig. A 221, 547 - 549 (1972)

dies.

Comparative studies on the isolation of sublethally injured Salmonellae in nine European laboratories

Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 167 - 174 (1973)

ELLIOT, R.P. u. MICHENER, H.P.

Microbiological process report

Appl. Microbiol. 9, 452 - 468 (1961)

ELLIOT, R.P. u. STRAKA, R.P.

Rate of microbial deterioration of chicken meat at 2 °C after freezing and thawing

Poultry Sci. 43, 81 - 86 (1964)

ENKIRI, N.K. u. ALFORD, J.A.

Relationship of the frequency of isolation of Salmonella to their resistance to drying and freezing

Appl. Microbiol. 21, 381 - 382 (1971)

ERNST, R. u. GURDAN, P.

Die Salmonella panama - Epidemie in Basel vom Frühjahr 1972

Schw. Arch. Tierhkd. 115, 8 - 15 (1973)

FENNEMA, O.

in: 'Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter'
Edt.: Fennema - Powrie - Marth
Verl. M. Decker, New York, 1973

FOX, M.D.

Recent trends in Salmonellosis epidemiology

J. Amer. Vet. Med. Assoc. 165, 990 - 993 (1974)

GEORGALLA, D.L. u. HURST, A.

The survival of food poisoning bacteria in frozen foods

J. appl. Bact. 26, 346 - 358 (1963)

GHONIEM, N.A.M.

Die Lebensfähigkeit einiger Salmonellenstämme und ihre pH - Werte in ägyptischem Joghurt bei verschiedener Lagerungstemperatur

Milchwissensch. 26, 418 - 420 (1971)

GHOSH, A.C.

An epidemiological study of the incidence of Salmonellosis in pigs

J. Hyg. 70, 151 - 160 (1972)

GIBSON, E.R.

Salmonellosis in calves

Vet. Rec. 73, 1284 - 1296 (1961)

GISSKE, W. - CORETTI, K. - BOZKURT, F.

Gefrierhackfleisch in hygienischer Sicht

Fleischwirtschaft 16, 747 - 750 (1964)

GLÄSSER, K. u. REUTER, H.

Ein bemerkenswerter Fall einer Fleischvergiftung

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 61, 85 - 86 (1948)

GÖTZE, U. Latente Salmonella - Infektionen bei Schlachttieren

Zbl. Vet. Med. B 15, 878 - 894 (1968)

ders.

Das hygienische Problem der latenten Salmonella - Infektion bei Schlachttieren

Fleischwirtschaft 52, 1154 - 1159 (1972)

GÖTZE, U. u. RETZLAFF, N.

Vorkommen von Salmonellen bei importierten Schlachtschweinen und die Folgen für die Fleisch- und Lebensmittelhygiene im erzeugergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Vieh und Fleisch im Rahmen der EWG

Fleischwirtschaft 46, 407 - 409 (1966)

GORRIL, R.H. u. McNEIL, E.M.

The effect of cold diluent on the viable count of Pseudomonas pyocyaneae

J. Gen. Microbiol. 22, 437 - 442 (1960)

GRUND, S.

persönl. Mitteilung, 1976

GUINÉE, P.A.M. - KAMPELMACHER, E.H. - HOFSTRA, K. - van KEULEN, A.

Salmonella in young piglets in the Netherlands

Zbl. Vet. Med. B 12, 250 - 257 (1965)

dies.

Salmonellae in healthy calves and cows in the Netherlands

Zbl. Vet. Med. B 11, 728 - 740 (1964)

GUINÉE, P.A.M. Zur Epidemiologie der Salmonellosen in den Niederlanden mit besonderer Bercücksichtigung der Ökologie von S. typhimurium

Bundesgesundheitsbl. 18, 406 - 407 (1975)

GUINÉE, P.A.M. u. VALKENBURG, J.

Salmonella isolations in the Netherlands, 1966 - 1973

Zbl. Bakt. I Orig. A 231, 97 - 107 (1975)

GUNDERSON, M.F. u. ROSE, K.D.

Survival of bacteria in precooked, fresh and frozen food

Food Res. 13, 254 - 263 (1948)

HABERMALZ, D.

Ein Beitrag zur latenten Salmonellainfektion deutscher Schlachtrinder

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 206 - 208 (1973)

HABS, H.

Die Anwendung des Bundesseuchengesetzes auf die Salmonellen unter Berücksichtigung ihrer Epidemiologie

in: 'Die Epidemiologie der Salmonellen'

Verl.: S. Fischer, Stuttgart, 1971

HADLOK, R.

Die lebensmittelhygiensiche und ernährungswirtschaftliche Bedeutung des Vorkommens von Salmonellen bei gesunden Schlachtschweinen

Selbstverlag, Gießen, 1966

HÄRING, W.

Das Vorkommen von Salmonellen in Mesenterial- und Portallymphknoten klinisch gesunder Schlachtschweine in dem Einzugsgebiet der Schlachthöfe Oldenburg und Wilhelmshafen

Vet. Med. Diss., Hannover, 1972

HAHN, S.S. u. APPLEMAN, M.D.

Microbiology of frozen orange concentrate

Food Technol. 6, 156 - 158 u. 165 - 167 (1952)

HAINES, R.B.

The growth of microorganisms on chilled and frozen meat

J. Soc. Chem. Ind. 50, 223 - 227 (1931)

ders.

The effect of freezing on bacteria

Proc. roy. Soc. Ser. B, 124, 451 - 463 (1938)

HARRIS, N.D.

The influence of the recovery medium and the incubation temperature on the survival of damaged bacteria

J. appl. Bact. 26, 387 - 397 (1963)

HARTSELL, S.E.

The longevity and behaviour of pathogenic bacteria in frozen foods : The influence of plating media

Amer. J. Publ. Hlth. 41, 1072 - 1077 (1951)

HEGARTHY, C.P. u. WEEKS, O.B.

Sensitivity of E. coli to cold shock during the logarithmic growth phase

J. Bact. 39, 475 - 484 (1940)

HERRMANN, K.

Tiefgefrorene Lebensmittel

Verl. P. Parey, Berlin 1970

HEUER, W.

Klinische und epidemiologische Beobachtungen an Gastroenteritiden hervorgerufen durch S. newport (paratyphus C - Gruppe)

Z. Ges. Inn. Med. 9, 333 - 338 (1954)

HORNUNG, B.

Diskussionsbemerkungen zum Thema Fleischvergiftungen

Zbl. Bakt. I Orig. 155, 233 (1950)

HUCKER, G.J.

Low temperature organisms on frozen vegetables

Food Technol. 8, 79 - 82 (1954)

HUGHES, L.E.

Bovine Salmonellosis in England and Wales

Brit. Vet. J. 127, 225 - 238 (1971)

IDZIAK, E.S. u. SUVANMONGHOL, P.

Effect of the pH on pathogenic functions of Salmonella typhimurium

Can. J. Microbiol. 18, 9 - 12 (1972)

IDZIAK, E.S. u. CROSSLEY, K.

Growth and virulence of Salmonella typhimurium grown in different foods

Appl. Microbiol. 26, 629 - 630 (1973)

INGRAM, M.

The effect of cold on microorganisms in relation to food

J. appl. Bact. 14, 243 - 260 (1951)

JANSSEN, D.W. u. BUSTA, F.F.

Influence of milk components on the injury, repair of injury, and death of Salmonella anatum cells subjected to freezing and thawing

Appl. Microbiol. 26, 725 - 732 (1973)

dies.

Injury and repair of several Salmonella serotypes after freezing and thawing in milk solids

J. Milk Fd. Technol. 36, 520 - 522 (1973)

JOHANNSEN, E.

Influence of various factors on the survival of Lactobacillus leichmanni during freezing and thawing

J. appl. Bact. 35, 415 - 418 (1972)

JOHNE, H.-J.

Die Vermehrung der Salmonellen bei tiefen Temperaturen

Vet. Med. Diss. München 1961

JUNGNITZ, M. u. LINSERT, H.

Auswertung der Kälbersektionen am Institut für Veterinärwesen Rostock und Schlußfolgerungen für eine erfolgreiche Prophylaxe

Mh. Vet. Med. 24, 937 - 941 (1969)

KALOJANOV, T.

Studien über die Vermehrung, den Wechsel der Virulenz und verwandter biologischer Eigenschaften einiger Salmonella - Arten

Vet. Med. Diss. Sofia 1972

KAMPELMACHER, E.H.

Weitere Feststellungen über das Vorkommen von Salmonellen in normal geschlachteten Schweinen

Vortr. 3. Symp. Int. Vet. Leb. Hyg., Nizza 27.5. - 2.6.1962

ders.

Epidemiologie, Bekämpfung und Verhütung der Salmonellose
in: 'Die Epidemiologie der Salmonellosen'

Verl. G. Fischer, Stuttgart 1971

KAMPELMACHER, E.H. - GUINÉE, P.A.M. - HOFSTRA, K. - van KEULEN, A.

Studies on Salmonella in slaughter-houses

Zbl. Vet. Med. B 8, 1025 - 1042 (1961)

dies.

Further studies on Salmonella in slaughter - houses and in normal slaughter - pigs

Zbl. Vet. Med. B 10, 1 - 24 (1963)

KHAN, M. u. KATAMAY, M.

Antagonistic effect of fatty acids against Salmonella in meat and bone meal

Appl. Microbiol. 17, 402 - 404 (1969)

KITCHELL, A.-G. u. INGRAM, M.

A comparison between bacterial growth on fresh meat and on frozen meat after thawing

Ann. Inst. Past., Lille, VIII, 121 - 131 (1956)

KLEIN, H.

Salmonella blockley als Ursache einer Lebensmittelvergiftung

Arch. Lebensmittelhyg. 10, 6 - 7 (1959)

KNOTHE, H. u. WIEDEMANN, B.

Haftung und Eliminierung von Salmonellen beim Menschen

Zbl. Bakt. Ref. 222, 279 - 286 (1970)

KOHN, A.

Lysis of frozen and thawed cells of E. coli by lysozyme, and their conversion into spheroblasts

J. Bact. 79, 697 - 706 (1960)

KOSSAKOWSKA, A. u. WOJTON, B.

Der Einfluß des Gefrierens auf das Verhalten und die Zugehörigkeit von Salmonella (engl. Zusammenfassung)

Med. Weter. 31, 114 - 116 (1975)

KOTTER, L. u. GEDEK, W.

Zur Bedeutung des Vorkommens von Salmonellen in Lebensmitteln tierischer Herkunft
in: 'Die Epidemiologie der Salmonellosen'

Verl. G. Fischer, Stuttgart 1971

KUSCHFELDT, D.

Neuere Erkenntnisse über die Salmonella - Infektion durch vom Tier stammende Lebensmittel

Fortschritte der Vet. Med., 9. Kongreßbericht H. 17, 163 - 166 (1972) Verl. Paul Parey, Berlin

LABIE, C.

Ätiologie und Prophylaxe der Fleischvergiftungen in Frankreich

Tierärztl. Umschau 22, 336 - 344 (1967)

LANG, K.

Beitrag zum Problem der Kontamination von Lebensmitteln mit Enteritissalmonellen durch den Menschen und der Verhütung von Kontaminationsfolgen

Alimenta 14, 71 - 78 (1975)

LARKIN, E.P. - LITSKY, W. - FULLER, J.F.

Faecal Streptococci in frozen foods

Appl. Microbiol. 3, 102 - 106 (1955)

LARKIN, J.M. u. STOKES, J.L.

Isolation of psychrophilic species of Bacillus

J. Bact. 91, 1667 - 1671 (1966)

LEMKE, H.

Vergleichende Untersuchungen über die natürlichen Antikörper und die orale Immunisierung gegen Typhus - Paratyphus beim Menschen und gegen S. typhimurium bei Kälbern

Math. Nat. Diss. Kiel 1968

LEWICKI, P.P. u. SILVERMAN, G.J.

Mechanisms concerned in the repair and recovery of sublethally injured cells occuring in foods
in: 'The Microbiology of Dried Foods'
Edt.: Kampelmacher, E.H. - Ingram, M. - Mossel, D.A.A.
Verl. Graaf'sche Ind., Haarlem 1969

LINDEBERG, G. u. LODE, A.

Release of ultraviolet - absorbing material from E. coli at subzero temperatures

Can. J. Microbiol. 9, 523 - 530 (1963)

LISTON, J. u. RAY, H.

Food poisoning problems of frozen seafoods

J. environment. Hlth. 25, 235 - 250 (1962)

van LOGTESTIJN, J.G.

Über den postmortalen pH - Verlauf im Fleisch und die Bedeutung für die Beurteilung von Schlachttieren

Tijdschr. diergeneesk. 91, 950 - 961 (1966)
ref.: Arch. Lebensmittelhyg. 19, 137 (1968)

LOVELOCK, J.E.

Denaturation of lipid - protein complexes as a cause of damage by freezing

Proc. Royal Soc. B 147, 427 - 433 (1957)

LUBIENIECKI, M. u. von SCHELHORN, M.

Vermehrung und Absterben von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Milieu unter besonderer Berücksichtigung technologischer Einflüsse

Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1, 89 - 95 (1972)

LÜTCHE, J. - STOLTE, B. - RÖHR, W.

Die bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung in den Jahren 1961 - 1970 festgestellten Salmonellen

Mh. Vet. Med. 26, 863 - 865 (1971)

LUYETT, B.

Recent developments in cryobiology and their significance in the study of freezing and freeze - drying in bacteria

Low Temperature Microbiol. Symp., Camden N.J., Campbell Soup Comp., 1962

LYNT, R.K.

Survival and recovery of enterovirus from foods

Appl. Microbiol. 14, 218 - 222 (1966)

MAJOR, C.P. - McDOUGAL, J.D. - HARRISON jr., A.P.

The effect of the initial cell concentration upon survival of bacteria at - 22 °C

J. Bact. 69, 244 - 249 (1955)

MARTH, E.H.

in:'Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter' Edt. Fennema - Powrie - Marth

Verl. M. Dekker Inc., New York, 1973

MATCHES, J.R. u. LISTON, J.

Low temperature growth of Salmonella

J. Fd. Sci. 33, 641 - 645 (1968)

MATTICK, A.T.R.

The effect of cold on microorganisms

Proc. Soc. Appl. Bact. 13, 211 - 215 (1951)

MAXCY, R.B.

Non lethal injury and limitations of recovery of coliform organisms on selective media

J. Milk Fd. Technol. 33, 445 - 450 (1970)

MAYR, A.

Umwelt und Zoonosen

Öff. Gesundh.-Wesen 35, 637 (1973)

MAZUR, P.

Manifestation of injury in yeast cells exposed to subzero temperatures

J. Bact. 82, 662 - 684 (1961)

ders.

Physical and chemical basis of injury in single - celled microorganisms subjected to freezing and thawing

in:'Cryobiology', Merryman, H.T.

Verl. Academic Press, London 1966

McCLESKY, C.S. u. CHRISTOPHER, W.N.

Some factors influencing the survival of bacteria in cold packed strawberries

Food Res. 6, 327 - 332 (1941)

McCULLOGH, N. u. EISELE, W.C.

Experimental human Salmonellosis

J. Infect. Dis. 89, 209 - 213, 259 - 265, 278 - 289 (1951)

McLEOD, R.A. - SMITH, D.H. - GELINAS, R.

Metabolic injury to bacteria

Can. J. Microbiol. 12, 61 - 71 (1966)

MEYNELL, G.G.

The effect of sudden chilling on E. coli

J. Gen. Microbiol. 19, 380 - 389 (1958)

MICHENER, H.D. - THOMPSON, P.A. - DIERTICH, W.C.

Time - temperature - tolerance of frozen foods XXII

Food Technol. 14, 290 - 294 (1960)

MICHENER, H.D. u. ELLIOTT, R.P.

Minimum growth temperature for food-poisoning, fecal indicator, and psychrophilic microorganisms

Adv. Food Res. 13, 349 - 396 (1964)

MORICHI, T.

Metabolic injury in frozen E. coli in: 'Freezing and Drying of Microorganisms', Edt.: Nei, T.

Verl. Univ. Tokyo Press, Tokyo 1969

MORSE, E.V. u. DUNCAN, M.A.

Salmonellosis - an environmental health problem

J. Amer. Vet. Med. Assoc. 165, 1015 - 1019 (1974)

MOSS, C.W. u. SPECK, L.M.

Injury and death of Streptococcus due to freezing and frozen storage

Appl. Microbiol. 11, 326 - 329 (1963)

dies.

Release of biologically active peptides from E. coli at subzero temperatures

J. Bact. 91, 1105 - 1111 (1966)

dies.

Identification of nutritional components in trypticase responsible for recovery of E. coli injured by freezing

J. Bact. 91, 1098 - 1104 (1966)

MOSSEL, D.A.A. u. RATTO, M.A.

Rapid detection of sublethally injured cells of enterobacteriaceae in dried foods

Appl. Microbiol. 20, 273 - 275 (1970)

MÜHLENBERG, W.

Epidemiologische Berichte der WHO über Salmonellen vom 29.11.1968

Gesundheitsw.-Desinf. 61/62, 43 - 45 (1969/70)

MÜHLENBERG, W. - HÖPKEN, W. - TACKE, B. - WOHLRAB, R.

Salmonellosen - unvermeidbare Ausbreitung oder sinnvolle Bekämpfung

Gesundheitsw.-Desinf. 65, 154 - 157 (1973)

NACKEBIJA, D.V.

Einfluß einiger physikalischer und chemischer Faktoren auf die Eigenschaften von Cl. perfringens

Russ. Bjull. vses. Inst. exper. Veter. Moskva 16, 24 - 26 (1973)
ref.: Landwirtsch. Zbl. IV 20, 281 (1975)

NAKAMURA, M. u. DAWSON, D.A.

Role of suspending and recovery media in the survival of frozen Shigella sonnei

Appl. Microbiol. 10, 40 - 43 (1962)

NEI, T.

Effects of freezing and freeze-drying in microorganisms
in: 'Recent Research in Freezing and Drying'
Verl. Blackwell, Oxford 1960

ders.

Freezing and freeze - drying of microorganisms

Cryobiol. 1, 87 - 93 (1964)

NEI, T. - ARAKI, T. - SOUZU, H.

Studies of the effect of drying conditions on residual moisture in the freeze - drying of microorganisms

Cryobiol. 2, 68 - 72 (1965)

NEI, T. - ARAKI, T. - MATSUSAKA, T.

Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of E. coli
in: 'Freezing and Drying of Microorganisms', Edt. T. Nei
Univ. Tokyo Press, Tokyo 1969

NICKERSON, J.T. u. SINSKEY, A.J.

The preservation of foods by freezing in: 'Microbiology of Foods and Food Processing'

Verl. Elsevier Publ. Co., New York 1972

NOSKOWA, G.L.

Mikrobiologie des Fleisches bei Kühllagerung

Verl. VEB Fachbuch, Leipzig 1975

O'BRIAN, J.D.P.

An outbreak of Samonella cholerae suis infection in a large pig fattening enterprise in Lancashire

Vet. Rec. 79, 558 - 560 (1966)

OLSEN, R.A. u. METCALF, E.S.

Conversion of mesophilic to psychrophilic bacteria

Sci. 162, 1288 - 1289 (1968)

OPRÊE, W.

Extratestinale Lokalisation von Enteritis-Salmonellen - epidemiologische Gesichtspunkte

Bundesgesundheitsbl. 19, 32 - 33 (1976)

PABLO, I.S. - SINSKEY, T.J. - SILVERMAN, G.J.

Selection of microorganisms due to freeze - drying

Food Technol. 21, 748 - 754 (1967)

PACKER, E.L. - INGRAHAM, J.L. - SEHER, S.

Factors affecting the rate of killing of Escherichia coli by repeated freezing and thawing

J. Bact. 89, 718 - 724 (1965)

PACHL, D.

Die Epidemiologie einer Typhimurium-Salmonellose

Vet. Med. Diss., Leipzig 1963

PETZOLD, G. u. SCHEIBNER, G.

Das Wachstumsspektrum von Salmonellen

Mh. Vet. Med. 20, 103 - 107 (1965)

PHILIPS GmbH

Temperaturmessungen mit Philips Miniatur - Mantel - Thermoelementen Thermocoax

Philips GmbH, Unternehmensbereich Elektronik für Wissenschaft und Industrie, Kassel

PIENING, C. u. WERMERSSEN, H.

Die Salmonellosebekämpfung des Rindes in Schleswig - Holstein

Dtsche. Tierärztl. Wschr. 79, 6 - 10 (1972)

PIERSON, M.D.

Biosynthesis during recovery of heat-injured S. typhimurium

J. Bact. 105, 1234 - 1236 (1971)

PIETKIEWICZ, K. u. BUCZOWSKI, Z.

Salmonellosis in man in Poland 1957 - 1966

Publ. Hlth. Rep. 84, 712 - 715 (1969)

PIETZSCH, O.

Vorkommen von Salmonella - Infektionen bei Tieren, Lebens- und Futtermitteln tierischer Herkunft in der Bundesrepublik

Zbl. Bakt. Ref. 222, 197 (1970)

PIETZSCH, O. u. BULLING, E.

Verbreitung der Salmonella - Infektionen bei Tieren, tierischen Lebens- und Futtermitteln in der Bundesrepublik Deutschland einschließlich Berlin (West)

Bundesgesundheitsbl. 16, 194 - 201 (1973)

dies.

Salmonella - Isolierungen aus Tieren sowie Lebens- und Futtermitteln in der Bundesrepublik 1961 - 1972

Zbl. Vet. Med. B 21, 336 - 343 (1974)

PÖHN, H.-P.

Ergebnisse des zentralen Überwachungsprogramms des Bundesgesundheitsamtes für Salmonellosen im Jahre 1973

Bundesgesundheitsbl. 18, 53 - 59 (1975)

ders.

Salmonellosen in den USA

ders.

Salmonellose - Überwachung beim Menschen, Jahresbericht 1974

Bundesgesundheitsbl. 18, 373 - 390 (1975)

POSTGATE, J.R. u. HUNTER, J.R.

On the survival of frozen bacteria

J. Gen. Microbiol. 26, 367 - 378 (1961)

PRESCOTT, S.C. u. GREER, L.P.

Observations on food poisoning organisms under refrigeration conditions

Refrig. Engineer 32, 211 - 212
282 - 284 (1936)

PRIMAVESI, K.

Über eine durch S. heidelberg hervorgerufene Krankenhausepidemie

Arch. Lebensmittelhyg. 7, 185 - 186 (1956)

PROCTOR, B.E. u. PHILLIPS, A.W.

Frozen precooked foods

Amer. J. Publ. Hlth. 38, 44 - 49 (1948)

PRUCHA, M.J. u. BRANNON, J.M.

Viability of Bact. typhosum in ice - cream

J. Bact. 11, 27 - 29 (1926)

RACCACH, M. u. JUVEN, B.

Studies of recovery of frozen Salmonella gallinarum: the roles of cooling rate, initial cell concentration and plating medium

J. Fd. Technol. 8, 211 - 216 (1973)

RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen

Zbl. Bakt. I Orig. A 197, 368 - 388 (1965)

RAJ, H. u. LISTON, J.

Survival of bacteria of public health significance in frozen sea - foods

Food Technol. 15, 429 - 434 (1961)

RANKIN, J.D. - TAYLOR, R.J. - BURROWS, M.

Salmonella - infection in young calves

Vet. Rec. 85, 582 - 584 (1969)

RALOVICH, B.

Über die Probleme der sogenannten Salmonella - Nahrungsmittelvergiftung

Zbl. Bakt. I Orig. A 208, 407 - 419 (1968)

RAPATZ, G. - MENZ, L.J. - LUYETT, B.J.

Anatomy of the freezing process in biological materials

in: 'Cryobiology'
Verl. Academic Press, New York 1966

RASCH, K.

Die Bekämpfung der Rindersalmonellose im Blickpunkt der Lebensmittelhygiene

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70, 161 - 162 (1957)

RAY, B. - JEZESKI, J.J. - BUSTA, F.F.

Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze - dried Salmonella anatum

Appl. Microbiol. 22, 184 - 189 (1971)

dies.

Repair of injury in freeze - dried S. anatum

Appl. Microbiol. 22, 401 - 407 (1971)

RAY, B. u. SPECK, M.L.

Metabolic process during the repair of freeze - injury in E. coli

Appl. Microbiol. 24, 585 - 590 (1972)

dies.

Repair of injury induced by freezing E. coli as influenced by recovery medium

Appl. Microbiol. 24, 285 - 263 (1972)

dies.

Enumeration of E. coli in frozen samples after recovery from injury

Appl. Microbiol. 25, 499 - 503 (1973)

RAY, B. - JANSSEN, D.W. - BUSTA, F.F.

Characterization of the repair of injury induced by freezing S. anatum

Appl. Microbiol. 23, 803 - 809 (1971)

RECORD, B.R. u. TAYLOR, R.

Some factors influencing the survival of Bact. coli on freeze - drying

J. Gen. Microbiol. 9, 475 - 484 (1953)

RENAULT, L. - MAIRE, Cl. - VAISSAIRE, J. - PALISSE, M. - LINDNER, Th.

Recrudescence des salmonelles animales en France, bilan des années 1961 - 1971

Bull. Acad. Vétér. France 45, 413 - 427 (1972)

REUTER, G.

Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 53 - 57 (1968)

RICHARDSON, A.

Outbreaks of bovine salmonellosis caused by serotypes other than S. dublin and S. typhimurium

J. Hyg. Camb. 74, 195 - 203 (1975)

RICHARDSON, A. u. WATSON, W.A.

A contribution to the epidemiology of S. dublin infection in cattle

Brit. Vet. J. 127, 173 - 183 (1971)

RICHARDSON, A. u. FAWCETT, A.R.

Salmonella dublin infection in calves: the value of rectal swabs in diagnosis and epidemiological studies

Brit. Vet. J. 129, 151 - 156 (1973)

ROBERTS, T.A.

Microbiological problems of freezing, cold storage and thawing of meat

Meat Res. Inst., 3. Symp., Bristol 23. - 24.4.1974

ROEMMELE, O. - SCHAPER, A. - van der WALL, G.

Ein praktisches Gerät zur dokumentarischen Feststellung des pH - Wertes, der Durchsaftung und des Blutgehaltes von Fleisch und Fleischwaren

Fleischwirtschaft 13, 208 - 209 (1961)

ROLLE, M. u. MAYR, A.

Mikrobiologie und Allgemeine Seuchenlehre , 3. Aufl.

Verl. F. Enke, Stuttgart 1966

RUPP, F.A.

Effects of freezing, dehydration and combination of processes on Salmonella in foods

Proc. Salmonella in Foods, Penn. State Univ., 1968

SATO, T.

On the mechanism of the death of bacteria by low temperature

Low Temp. Sci. B 12, 39 - 61 (1954)

SATO, S.

Morphological and functional changes of Bac. megatherium caused by freeze thawing or freeze - drying

Low Temp. Sci. B 16, 107 - 127 (1958)

SADEK, G. - SHAHEEN, Y. - NAGUIB, K. - SABBOUR, M.

The viability of Salmonella typhimurium in ice - cream

Zbl. Bakt. II 128, 93 - 96 (1973)

SCHEIBNER, G.

Zum Vorkommen von Histidin - Decarboxydase bei Salmonellen-Stämmen verschiedenster Serotypen

Zschr. Ges. Hyg. 14, 204 - 212 (1968)

SCHEPER, J.

Was sagt der pH - Wert über erblich bedingte Veränderungen in der Beschaffenheit von Schweinefleisch aus?

Fleischwirtschaft 53, 647 - 650 (1973)

SCHITTENHELM, P.

Die Einwirkung tiefer Temperaturen auf Salmonellen und Staphylokokken in Nahrungsmitteln

Med. Diss. Tübingen 1964

SCHMIDT, D. u. WITTMANN, E.

Erfahrungen beim Einsatz von Formol - Adsorbat - Vakzinen gegen Salmonella cholerae suis in Schweinebeständen

Mh. Vet. Med. 23, 86 - 89 (1968)

SCHMIDT - LORENZ, W.

Mikrobieller Verderb gefrorener Lebensmittel während der Gefrierlagerung

Kältetechn. 15, 379 - 383 (1963)

ders.

Psychrophile Mikroorganismen und tiefgefrorene Lebensmittel

Alimenta 9, 32 - 45 (1970)

ders.

Mikrobiologische Probleme bei tiefgefrorenen und gefriergetrockneten Lebensmitteln

Alimenta 9, 245 - 252 (1970)

ders.

Physiologie des Wachstums von Mikroorganismen bei tiefen Temperaturen

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 268 - 272 (1972)

ders.

Bedeutung der Anwesenheit von Mikroorganismen in gefrorenen und tiefgefrorenen Lebensmitteln

Erweit. Manuskript des Plenarvortrages anläßl. d. Intern. Symp. of Food Microbiology, Mailand, März 1974

SCHMIDT - LORENZ, W. u. GUTSCHMIDT, G.

Mikrobielle und sensorische Veränderungen gefrorener Lebensmittel bei Lagerung im Temperaturbereich von - 2.5 °C bis - 10 °C

Lebensm. Wiss. Technol. 1, 26 - 43 (1968)

dies.

Mikrobielle und sensorische Veränderungen gefrorener Brathähnchen und Poularden bei Lagerung im Temperaturbereich von - 2.5 °C bis - 10 °C

Fleischwirtschaft 49, 1033 - 1038 (1969)

SCHÖLL, W. - SEYFARTH, D. - MEESE, M.M. - PEEL, K.H.

Die Salmonella cholerae suis - Bestandsinfektion, Darstellung von Problemen und Lösungsvarianten

Mh. Vet. Med. 28, 201 - 205 (1973)

SCHÖN, L.

Einfluß des Vermarktungs- und Schlachtprozesses auf die Gewebebeschaffenheit von Schweinefleisch

Fleischwirtschaft 54, 544 - 546, 549 (1974)

SCHOOP, G.

Einfluß des Wandels der umweltlichen Verhältnisse auf die Zoonosenproblematik dargestellt am Beispiel der Salmonellose

Zbl. Bakt. I Orig. B 156, 181 - 186 (1972)

van SCHOTHORST, M. u. van LEUSDEN, F.M.

Studies on the isolation of injured Salmonellae from foods

Zbl. Bakt. I Orig. A 221, 19 - 29 (1972)

dies.

Further studies on the isolation of injured Salmonellae from foods

Zbl. Bakt. I Orig. A 230, 186 - 191 (1975)

SCHÜTZ, G.

Über das Vorkommen seltener Salmonella-Typen in Galle und Kot gesund geschlachteter Rinder

Vet. Med. Diss., München 1968

SCHULZ, W. - KIUPEL, H. - GÜNTHER, H.

Die Salmonellose des Rindes - Vorkommen, wirtschaftliche Bedeutung, Epizootiologi

Mh. Vet. Med. 30, 530 - 534 (1975)

SEELIGER, H.P.R.

Häufigkeit und Ursache mikrobieller Nahrungsmittelvergiftungen

Bundesgesundheitsbl. 13, 211 - 212 (1970)

SIEMS, H.

Verfahren zur Kultivierung von subletal geschädigten Salmonellen aus Lebensmitteln

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 273 - 276 (1974)

SIMON, E. - STAHL, K.L. - WILSON, J.B.

Preservation by freeze - drying and the stability of virulence of S. typhimurium

Appl. Microbiol. 11, 371 - 376 (1963)

SIMS, J.E. - KELLEY, D.C. - FOLTZ, U.P.

Effects of time and temperature on Salmonellae in inoculated butter

J. Milk Fd. Technol. 32, 485 - 488 (1969)

SINELL, H.-J. - REUTER, G. - UNTERMANN, F.

Zur Standardisierung der aeroben Gesamtkeimzahlbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen, 1. Mitt.

Arch. Lebensmittelhyg. 16, 217 - 224 (1965)

SINELL, H.-J. - UNTERMANN, F. - REUTER, G.

Zur Standardisierung der aeroben Gesamtkeimzahlbestimmung in Fleisch und Wurstwaren, 2. Mitt.

Arch. Lebensmittelhyg. 17, 25 - 31 (1966)

SINSKEY, T.J. - SILVERMAN, G.J. - GOLDBLITH, S.A.

Influence of plate temperatures and relative humidity during storage on the survival of freeze - dried Salmonella typhimurium

Appl. Microbiol. 15, 22 - 30 (1967)

SKOVGARD, N. u. BREST - NIELSEN, B.

Salmonella in pigs and animal feeding stuffs in England, Wales and Denmark

J. Hyg. 70, 127 - 140 (1972)

SOJKA, W.J. u. FIELD, H.J.

Salmonellosis in England and Wales 1958 - 1967

Vet. Bull. 40, 515 - 531 (1970)

SORRELLS, K.M. - SPECK, M.L. - WARREN, V.A.

Pathogenity of Salmonella gallinarum after metabolic injury by freezing

Appl. Microbiol. 19, 39 - 43 (1970)

SPECK, M.L. u. COWMAN, R.A.

Metabolic injury to bacteria resulting from freezing
in: 'Freezing and Drying of Microorganisms', Edt. T. Nei
Univ. Tokyo Press, Tokyo 1969

SPECK, M.L. - RAY, B. - READ jr., R.B.

Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure

Appl. Microbiol. 29, 549 - 550 (1975)

SPLITTSTOESSER, D.F. u. WETTERGREEN, W.P.

The significance of coliforms in frozen vegetables

Food Technol. 18, 392 - 394 (1964)

SQUIRES, R.W. - HARTSELL, S.E.

Survival and growth initiation of defrosted E. coli as affected by frozen storage

Appl. Microbiol. 3, 40 - 42 (1952)

STELLMACHER, W.

Sanierungsversuche in einem Rinderbestand mit S. dublin

Mh. Vet. Med. 18, 296 - 302 (1963)

STILLE, B.

Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen

Arch. Mikrobiol. 14, 554 - 587 (1950)

STOKES, J.L. - OSBORNE, W.W.

Penetration and growth of Salmonella in shell - eggs

Food Res. 21, 510 - 518 (1956)

STOLLE, F.A.

Klinische Bestandsinspektionen sowie Untersuchungen auf Salmonellose, Leptospirose und Brucellose in Schweinebeständen im Hinblick auf eine vorverlegte Schlachttieruntersuchung

Vet. Med. Diss., Berlin 1974

STRAKA, R.P. u. STOKES, J.L.

Metabolic injury to bacteria at low temperatures

J. Bact. 78, 181 - 185 (1959)

STRANGE, R.E. u. NESS, A.G.

Effect of chilling on bacteria in aqueous suspension

Nature 197, 819 (1963)

SULZBACHER, W.L.

Effect of freezing and thawing on the growth rate of bacteria in ground meat

Food Technol. 6, 341 - 343 (1952)

TACKE, B. - MÜHLENBERG, W. - HÖPKEN, W.

Weitere Erfahrungen mit einer regionalen aktuellen Salmonella-Übersicht in den Jahren 1970, 1971 und 1972

Gesundheitsw.Desinf. 65, 147 - 154 (1973)

TÄNDLER, K.

Fleischreifung unter Dehnfolienumhüllung

Fleischwirtschaft 53, 674 - 676, 679 (1973)

TÄNDLER, K. u. HEINZ, G.

Frischfleischreifung im Vakuumbeutel

Fleischwirtschaft 50, 1185 - 1190, 1193 (1970)

THATCHER, F.S. u. CLARK, D.S.

Microorganisms in Foods - Their Significance and Methods of Enumeration

Univ. Toronto Press, Toronto 1968

TITZE, W.

Salmonellosen in der Oberpfalz und Niederbayern während der Jahre 1959 - 1969

Öff. Gesundheitswes. 32, 593 - 603 (1970)

TOMLINS, R. u. ORDAL, Z.J.

Requirements of S. typhimurium for recovery from thermal injury

J. Bact. 105, 512 - 518 (1971)

TOSCHKOFF, A. - KALOJANOV, I. - VELJANOV, D.

Über die Vermehrung und Virulenz von Salmonella typhimurium in Fleisch Salmonellen-infizierter Tiere

Zbl. Vet. Med. B 13, 297 - 305 (1966)

TOYOKAWA, K. u. HOLLANDER, D.H.

Variation in sensitivity of E. coli to freezing damage during the growth cycle

Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 92, 499 - 500 (1956)

TRÜB, C. u. REPLOH, H.

Erkrankungen durch Lebensmittel in der Nachkriegszeit (1946 - 1950) im Lande Nordrhein - Westfalen

Arch. Hyg. 138, 98 - 104 (1954)

UNTERMANN, F.

Einfluß verschiedener Verdünnungstechniken auf die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 254 - 258 (1967)

VARENNE, H.

Intoxication alimentaire massive d'origine carnée par Salmonella typhimurium

Rec. Méd. Vét. 130, 298 - 304 (1954)

WALLACE, G.I.

The survival of pathogenic microorganisms in ice - cream

J. Dairy Sci. 21, 35 - 36 (1938)

WALLACE, G.I. u. PARK, S.E.

Microbiology in frozen foods IV: Longevity of certain pathogenic bacteria in frozen cherries and in frozen cherry juice

J. Infect. Dis. 52, 146 - 149 (1933)

WARSECK, M. - RAY, B. - SPECK, M.L.

Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods

Appl. Microbiol. 26, 919 - 924 (1973)

WEISE, H.J.

Salmonellose - Zivilisationsseuche

Bundesgesundheitsbl. 19, 17 - 20 (1976)

WEISER, R.S. u. OSTERUD, C.H.

Studies on the death of bacteria at low temperatures I

J. Bact. 50, 413 - 439 (1945)

WEISER, R.S. u. HARGISS, C.O.

Studies on the death of bacteria at low temperatures II

J. Bact. 52, 71 - 79 (1946)

WILSON, G. u.MILES, A.

in: 'Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity' 4. Aufl.

Edward Arnolds Publ., London 1957

WINKLE, S. u. ROHDE, R.

Diagnostische und epidemiologische Erfahrungen aus dem Tätigkeitsbereich der Hamburger Salmonella - Zentrale

Arch. Hyg. 148, 388 - 424 (1964)

WOHLFAHRT, E.

Zur Epizootiologie und Bekämpfung der Salmonellose in Schweinebeständen

Mh. Vet. Med. 26, 65 - 69 (1971)

WOODBURN, M.J. u. STRONG, D.H.

Survival of Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Streptococcus faecalis in simplified food substrates

Appl. Microbiol. 8, 109 - 113 (1960)

YURCHENCO, J.H. - PIEPOLI, C.R. - YURCHENCO, M.C.

Low temperature storage for maintaining stabile infectious bacterial pools

Appl. Microbiol. 2, 53 - 55 (1954)

YUZABURO, I.

Microorganisms in refrigerated storage and freezing

J. Fd. Sci. Technol. 18, 538 - 546 (1971)

ZAWADZKI, Z. u. POGORZELSKA, E.

Investigations on the influence of refrigeration, storage and thawing on the number of Salmonella typhimurium in artificially infected meat (engl. Zus.)

Medycyna Weter. 31, 488 - 491 (1975)

dies.

Survival of Salmonella typhimurium in frozen beef (engl. Zusammenfassung)

Weterynaria Olsztyn 2, 117 - 124 (1974)

ZETKIN, M. u. SCHALDACH, H.

Wörterbuch der Medizin

Verl. Volk und Gesundheit, Berlin 1964

ZIPPLIES, G.

Salmonellenfunde in der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung

Mh. Vet. Med. 19, 588 - 591 (1964)

An dieser Stelle sei meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Reuter, für die Überlassung des Themas, für zahlreiche Anregungen und jederzeit freundlich gewährten Rat herzlich gedankt.

Herr Prof. Dr. H. Weiß, Herr Dr. F. J. Kretschmer und Herr H. Berner von der Fachrichtung Biometrie waren bei der Lösung statistischer Probleme behilflich und führten die Varianzanalyse durch. Herr Prof. Dr. S. Grund von der Fachrichtung Elektronenmikroskopie unterstützte die Arbeiten mit cryobiologischen Hinweisen.

Ihnen allen sowie den Mitarbeitern der Fachrichtung Fleischhygiene, die mir ihre Unterstützung zuteil werden ließen, sei gleichfalls Dank gesagt.

Die experimentellen Untersuchungen wurden durch die finanzielle Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen eines Forschungsvorhabens ermöglicht.

Lebenslauf

Geburtsdatum:	22. August 1947
Eltern:	K. R. Riemer, Fabrikant
	Rita Riemer, Angestellte
Schulen:	3. Grundschule, Berlin 42
	Luisenstiftung, Berlin 33
Abitur:	9. März 1967
Beruflicher Werdegang:	SS 1967 bis WS 1968/69 Studium der Rechtswissenschaften an der Freien Universität Berlin. Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin im WS 1968/69; Ablegung der Gesellenprüfung im Fleischerhandwerk im Frühjahr 1970; Bestallung zum Tierarzt am 6. November 1974.
	Seit dem 15. Oktober 1974 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fachrichtung Fleischhygiene des Institutes für Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie tätig.